FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° 2

SUR LE DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES CHEZ LES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS

THÈSE

présentée et publiquement soutenue

devant la Faculté de Pharmacie de Marseille

MAI 1971

par

Bernadette MELQUIOND-FOURNIER

née le 14 Novembre 1946 à Brest (Finistère)

Pharmacien

Préparateur de Cours de Chimie

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse	MM. les Professeurs	J.-C. DUMAZERT	Président
	»	F. PELLISSIER	
	»	P. BERNARD	Assesseurs
	»	C. GHIGLIONE	

LINO-IMP - MARSEILLE

Bernadette MELQUIOND-FOURNIER

Pharmacien

Préparateur de Cours de Chimie

SUR LE DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES CHEZ LES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS

Travail du Laboratoire de Chimie
de la Faculté de Pharmacie de Marseille

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Doyen : C. GREBUS

Assesseurs : J. PASTOR, A. CREVAT

Attaché Principal, Responsable des Services administratifs: P. MOUCHET

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs honoraires

MM. MERCIER, VIGNOLI

Professeurs titulaires

Botanique et cryptogamie	MM PELLISSIER
Chimie	DUMAZERT
Chimie analytique et hydrologie	PASTOR
Chimie biologique	REYNAUD
Chimie générale	BARET
Chimie minérale	MOURGUE
Pharmacie chimique et Législation pharmaceutique	CRISTAU
Pharmacie galénique et Matière médicale	BERNARD P.
Pharmacologie pharmaceutique	MERCIER J.
Physique	CREVAT
Toxicologie	VIALA
Zoologie et Microbiologie	GREBUS

Professeurs sans Chaire

MM. GHIGLIONE, LANZA M.

Maître de Conférences agrégé honoraire

M. GUILLOT J.

Maîtres de Conférences agrégés

Mlle CREMIEUX	MM. GOUEZO
MM. ARNOUX A.	REGLI
GAYTE-SORBIER	SOYFER

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545820_0022

A mes Parents

en témoignage de ma reconnaissance et de ma tendresse.

A mon Mari et à mon Fils Grégoire

en témoignage de mon amour.

A ma Famille

A Monsieur le Professeur J.C. DUMAZERT

Chevalier de la Légion d'Honneur

qui nous a accueillie avec bienveillance dans son Laboratoire et nous a fait le grand honneur de présider notre Jury de Thèse.

Qu'il veuille trouver ici avec nos remerciements, l'expression de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur F. PELLISSIER

Chevalier de la Légion d'Honneur

qui nous a fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur P. BERNARD

dont nous avons apprécié l'admirable enseignement au cours de nos années d'études.

Nous le remercions d'avoir bien voulu siéger dans notre Jury de Thèse et lui exprimons nos sentiments de sincère gratiude.

A Monsieur le Professeur C. GHIGLIONE

qui nous a tout appris et qui a dirigé notre travail avec une gentillesse et une bienveillance sans égales.

Qu'il nous soit permis de le remercier ici de tout ce qu'il a fait pour nous et de lui exprimer, avec notre grande admiration, notre très profond et très sincère attachement.

A Madame T. PUGNET, Maître-Assistant

A Madame M. GIRAUD, Assistant

dont nous avons apprécié la très aimable et très efficace collaboration au cours de ce travail.

Qu'elles trouvent ici nos remerciements les plus sincères.

A Madame F. GHIGLIONE

avec notre reconnaissance et notre affection.

A tous nos amis du Laboratoire de Chimie et en particulier à Monsieur D. TRANCHAND.

INTRODUCTION

Les acides organiques aliphatiques polyfonctionnels à chaînes courtes, occupent une place particulièrement importante dans la Biochimie des êtres vivants. Les feuilles des végétaux supérieurs ont constitué un matériel de choix pour l'étude de leur biosynthèse, de leur dégradation et des variations d'énergie qui accompagnent ces processus. Les mêmes enchaînements réactionnels se retrouvant dans l'ensemble du règne végétal, on peut supposer que la répartition des acides organiques doit être analogue dans toutes les espèces. Or, il n'en est rien, et l'on sait que certains d'entre eux s'accumulent préférentiellement. La nature des acides ainsi stockés varie selon le végétal, ses différentes parties et son degré de maturité.

Cette accumulation n'est pas due, en règle générale, à une paralysie de tel ou tel système métabolique, paralysie qui entraînerait le blocage de la synthèse au niveau des acides qui sont les plus facilement accumulés, mais au contraire, est due à des réactions secondaires. Les nombreuses recherches qui ont été réalisées ces dernières années, grâce à l'utilisation des techniques mettant en œuvre les méthodes chromatographiques et les molécules marquées au ^{14}C, ont développé nos connaissances en ce domaine.

La synthèse des acides est liée aux phénomènes respiratoires, leur dégradation aux phénomènes énergétiques. L'anabolisme aussi bien que le catabolisme des acides conduit à l'élaboration des squelettes hydrocarbonés des amino-acides, des lipides et des glucides en tant que substances de réserve et de constitution. Ils fournissent également les enchaînements de base des terpènes, des stéroïdes, des caroténoïdes, des cycles aromatiques et des noyaux hétérocycliques (porphyrines, alcaloïdes etc...).

Le bilan qualitatif et quantitatif des acides organiques contenus dans un matériel végétal est délicat à établir avec précision en raison des difficultés rencontrées : manque de réaction spécifique pour la plupart, instabilité pour certains.

Avant d'aborder la relation de nos recherches, il nous a semblé utile d'exposer brièvement, d'une part les données biochimiques relatives au métabolisme des acides organiques et, d'autre part, de fournir un aperçu des techniques analytiques utilisées actuellement pour leur caractérisation et leur dosage.

EXPOSÉ BIBLIOGRAPHIQUE

I. — METABOLISME DES ACIDES ORGANIQUES

A) Fixation du gaz carbonique par les végétaux (52)

Dès 1843, LIEBIG observe qu'au cours de la maturation des végétaux la concentration en acides organiques diminue alors que celle des glucides augmente. L'hypothèse de travail qu'il propose admet que les acides sont les intermédiaires de la réduction du gaz carbonique en oses puisque le degré d'oxydation du groupement carboxylique est situé entre celui du gaz carbonique et celui des sucres. Cette conception fut abandonnée au profit de celle émise par VON BAYER (1870) qui admet la formation primaire de l'aldéhyde formique et sa polymérisation en glucides. C'est à CALVIN et à ses collaborateurs que l'on doit le développement des recherches actuelles sur la fixation du gaz carbonique au cours de la photosynthèse. De l'ensemble des très nombreux travaux effectués, on peut dire que l'assimilation du gaz carbonique se réalise selon cinq voies principales :

— la carboxylation du ribulose, 1-5, diphosphate
— la bétacarboxylation du phospho-énolpyruvate
— les étapes réversibles de la décarboxylation oxydative
— l'utilisation des enzymes à biotine
— la formation du carbamyl-phosphate

1° *Carboxylation du ribulose, 1-5, diphosphate*

C'est quantitativement la voie principale. L'équation globale des échanges gazeux s'écrit :

$$CO_2 + 2\,H_2O \longrightarrow H\text{-}C\text{-}OH + O_2 + H_2O$$

La figure n° 1 illustre, d'une manière schématique, les différentes réactions qui s'effectuent au niveau des chloroplastes.

La première étape est dépendante de la lumière. C'est un ensemble de réactions photochimiques dans lesquelles l'eau joue le

rôle de donneur d'électrons à l'accepteur : le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NADP) avec formation d'énergie chimique sous forme d'adénosine-triphosphate (ATP).

La deuxième étape constitue une suite de réactions dites sombres car indépendantes des photons. Le gaz carbonique se fixe sur le ribulose-1, 5-diphosphate (Ru-di-P). L'acide β-cétonique formé se scinde en deux molécules d'acide 3-phosphoglycérique (PGA)

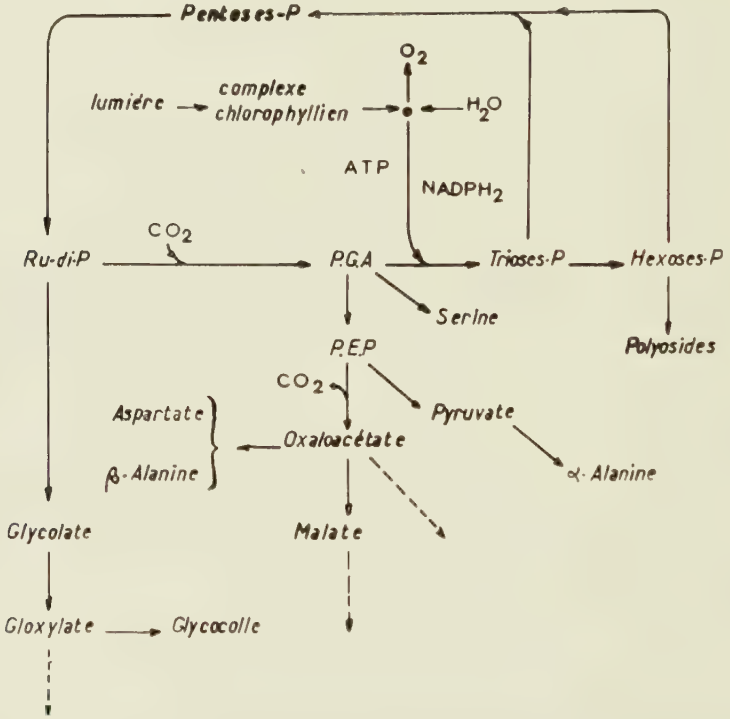
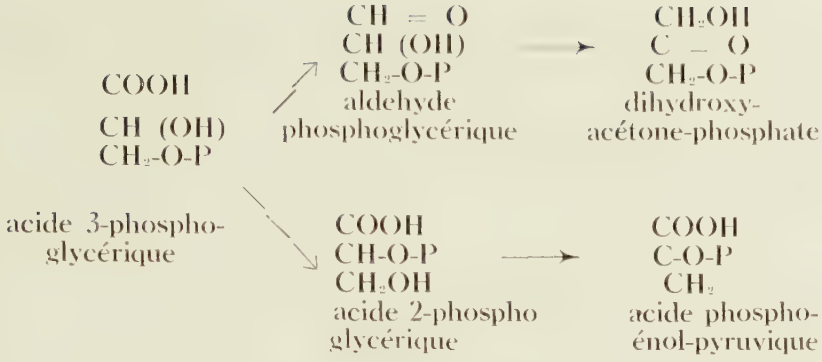


FIG. N° 1. — Schéma simplifié de l'assimilation du gaz carbonique au niveau des chloroplastes.

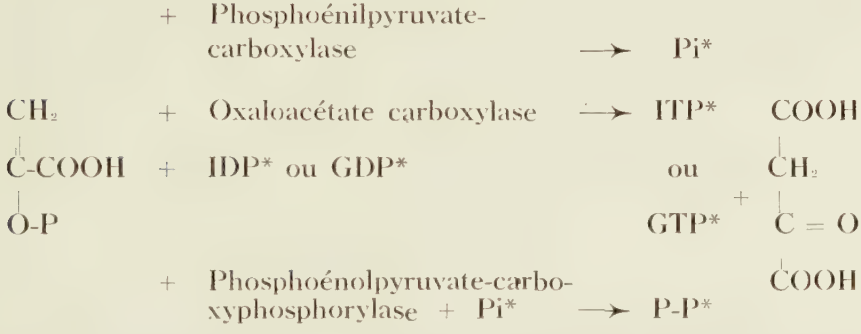
en présence de ribulose-phosphate-carboxylase. Le PGA, en présence d'ATP et de phosphoglycérokinase donne l'acide 1-3, diphosphoglycérique qui est réduit par la phosphoglyceraldehyde-deshydrogénase en présence de $NADPH_2$.

L'aldehyde phosphoglycérique, selon les étapes réversibles de la glycolyse, conduit aux trioses-phosphates et aux hexoses-phosphates lesquels, d'une part, par l'intermédiaire des pentoses phosphorylés, régénèrent le Ru-di-P, et d'autre part, sont stockés sous forme de polyosides (saccharose, amidon...). Le PGA fournit le dihydroacétone-phosphate pour conduire au sédoheptulose. Il conduit également à l'acide phosphoénol-pyruvique (PEP) terme important du métabolisme.



2° β-carboxylation du phospho-énol-pyruvate

Trois systèmes enzymatiques permettent de fixer le gaz carbonique sur le phospho-énol-pyruvate pour fournir l'acide oxalacétique.



---

* : Pi : phosphate
P-P : pyrophosphate
IDP et GTP : inosine-di et tri-phosphate
GDP et GTP : guanosine-di et tri-phosphate

3° Réversibilité des carboxylations oxydatives

Trois réactions de décarboxylation sont réversibles et possèdent entre elles des caractères communs. Un enzyme assure la déshydrogénation et la décarboxylation. Ces réactions ne sont possibles que si la concentration du composé carbonylé formé est négligeable par suite d'une reprise immédiate dans d'autres réactions.

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + CO_2 \xrightarrow[\text{malique}]{\text{enzyme}} HOOC\text{-}CH\ (OH)\text{-}CH_2\text{-}COOH$$

$$HOOC\text{-}(CH_2)_2\text{-}CO\text{-}COOH + CO_2 \xrightarrow[\text{déshydrogénase}]{\text{iso-citrate}} HOOC\text{-}(CH_2)_2\text{-}C\ (OH)\begin{matrix}\diagup\ COOH\\ \diagdown\ COOH\end{matrix}$$

$$HO\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}CH\ (OH)\text{-}CH\ (OH)\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}P + CO_2 \xrightarrow[\text{déshydrogénase}]{\text{phosphogluconate}} \begin{matrix}CH\ (OH)\text{-}CH\ (OH)\text{-}COOH\\ |\\ CH\ (OH)\text{-}CH\ (OH)\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}P\end{matrix}$$

4° Enzymes à biotine

L'intérêt des enzymes à groupement biotine a été mis particulièrement en évidence par LINEN. La biotine est liée à une fonction α-aminée d'un radical lysine de la protéine enzyme. Le gaz carbonique se fixe en présence d'ATP. Il se forme tout d'abord une carboxy-biotine qui cède le carbonyl activé à un accepteur. Les enzymes actuellement connus sont :

— la pyruvate-carboxylase
— la propyl-CoA-carboxylase
— l'acetyl-CoA-carboxylase
— la β-méthyl-crotonyl-CoA-transcarboxylase

5° Formation du carbamyl-phosphate

Chez les végétaux supérieurs la réaction comprend deux étapes : dans un premier temps on assiste à la formation non enzymatique de l'acide carbamique, suivie de la phosphorylation de cet acide par l'ATP en présence de carbamate-kinase.

$$NH_4^+ + HCO_3^- \longrightarrow H_2N\text{-}COOH + H_2O$$

$$H_2N\text{-}COOH + ATP \longrightarrow H_2N\text{-}CO\text{-}O\text{-}P + ADP$$

B) Les oxydations cellulaires

Les oxydations cellulaires correspondent à des phénomènes de décarboxylation et de déshydrogénation fournissant à la cellule l'énergie chimique nécessaire à la vie. Essentiellement l'ensemble de ces réactions constitue le cycle des acides tricarboxyliques ou cycle de KREBS. Après les travaux préliminaires de MARTIUS et KNOOP (1937), de KREBS et JOHNSON (1939), il a fallu attendre 1950 pour que les points suivant soient définis :

— Les enzymes qui catalysent les processus du cycle sont localisés chez les animaux et les végétaux dans les mitochondries.

— Les réactions d'oxydoréduction sont couplées avec la synthèse des liaisons phosphates riches en énergie.

— Le cycle est directement lié à la chaîne des transporteurs d'électrons (pyridine-nucléotide, cytochrome).

Le bilan du cycle de KREBS, schématisé dans la figure n° 2, correspond à la combustion totale d'une molécule d'acide pyruvique.

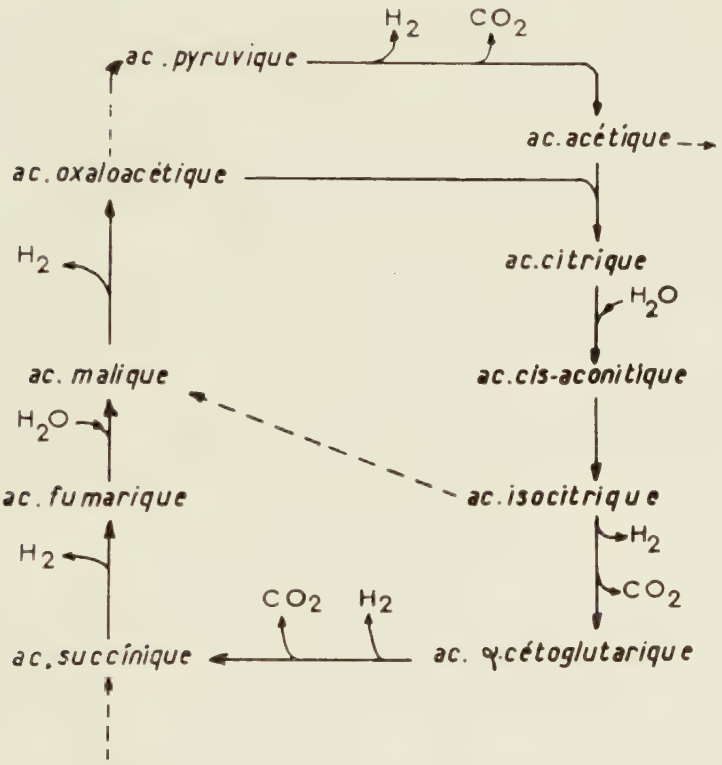


FIG. N° 2. — Représentation schématique du cycle de KREBS

C) Catabolisme (61)

Les substances catabolisables sont les acides gras à longues chaînes (lipides), les hexoses et les amino-acides. Les voies générales aboutissent à l'acétyl-CoA qui est le terme de la dégradation. Ce dernier alimente le cycle tricarboxylique qui fournit l'énergie à la cellule. Peu de substances fournissent des composés di-carbonés plus oxygénés que l'acide acétique, c'est-à-dire : les acides glyoxylique, glycolique et oxalique. Les hexoses et le glycérol, par la voie classique, conduisent au phosphoglycérate puis à l'acide pyruvique, qui pourra, selon les conditions de fonctionnement de la chaîne d'oxydo-réduction, donner l'acide lactique ou plus nor-

malement l'acide acétique. Les acides gras, par la béta-oxydation de KNOPP, aboutissent eux aussi, à l'acide acétique sous forme d'Acetyl-CoA.

En ce qui concerne les amino-acides le problème se complique du fait des différences importantes existant dans les squelettes hydrocarbonés de ces composés. La figure n° 3 illustre les réactions de dégradation des principaux amino-acides.

Le passage des amino-acides aux acides organiques se fait par désamination-oxydative ou par transamination. On classe les oxydases selon la nature du substrat (oxydases des acides L-aminés, des acides D-aminés, oxydases spécifiques) ou selon la nature de

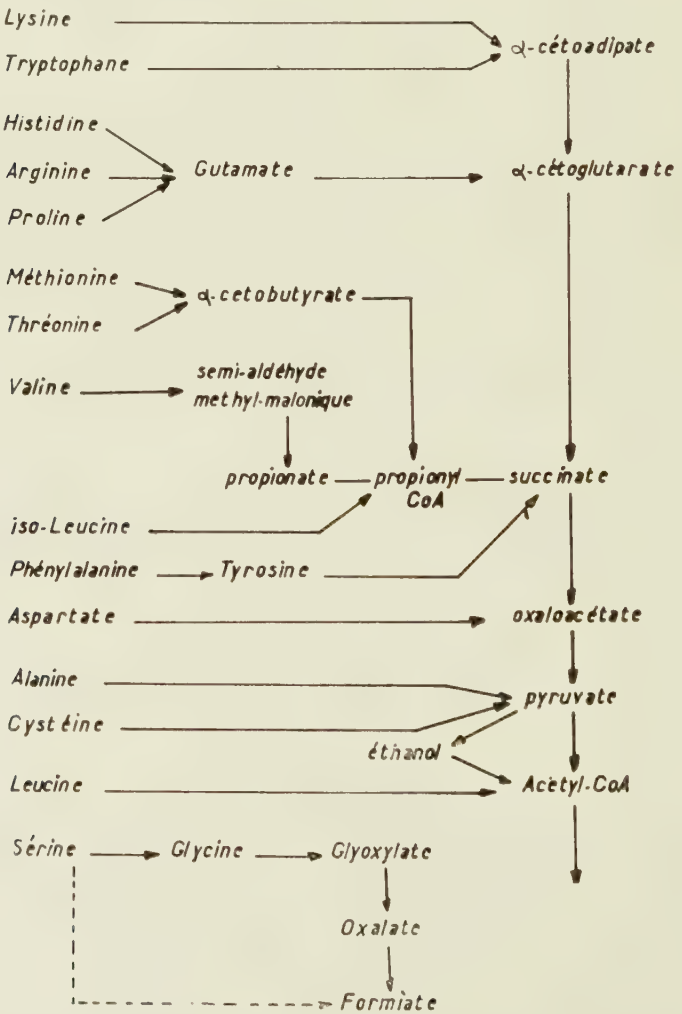


FIG. N° 3. — Principales réactions de dégradation des amino-acides aboutissant à la formation d'acides organiques.

l'accepteur d'hydrogène. Si la réaction est aérobie l'accepteur est l'oxygène. En anaérobiose intervient un coenzyme accepteur d'hydrogène couplé au système des cytochromes. Les oxydases aérobies sont des flavoprotéines. L'oxydation de l'acide L-glutamique, pour fournir l'acide alpha-céto-glutarique, est une réaction fondamentale du cycle de l'azote. Les désaminases non-oxydatives sont en fait des déshydratases. Quoi qu'il en soit on aboutit à des acides cétoniques et en fin de réaction à l'acide pyruvique qui conduit à l'acétyl-CoA brûlé dans le cycle de KREBS.

D) Anabolisme (61)

Le cycle des acides tricarboxyliques lié aux β-carboxylations permet d'expliquer l'ensemble des processus bio-synthétiques lorsque la source de carbone est constituée par les molécules glucidiques qui aboutissent à l'acide pyruvique. Dans certains cas, et en particulier, lorsque la source de carbone est constituée par des acides gras (ex. : germination des oléagineux) le terme ultime de la dégradation de la matière de réserve est l'Acetyl-CoA. THURNBERG avait proposé dès 1920 un cycle d'oxydation de l'acide lactique mais ceci n'a pu être démontré expérimentalement. La cellule végétale ne peut synthétiser l'acide pyruvique à partir de l'acide acétique, de même, la condensation directe de deux molécules d'acide acétique en acide succinique n'est pas possible. KREBS et KORNBERG ont décrit un cycle, dit cycle de l'acide glyoxylique, schématisé dans la figure n° 4, qui explique les étapes du passage de l'acide acétique activé à l'acide succinique.

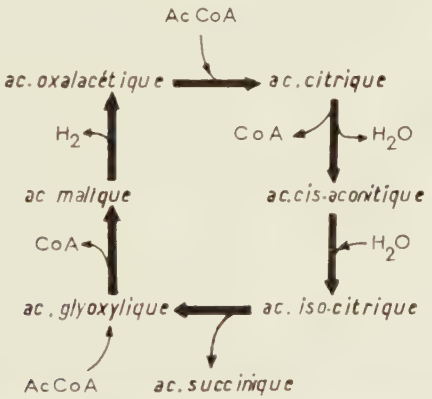


FIG. N° 4. — Cycle de l'acide glyoxylique selon KREBS et KORNBERG.

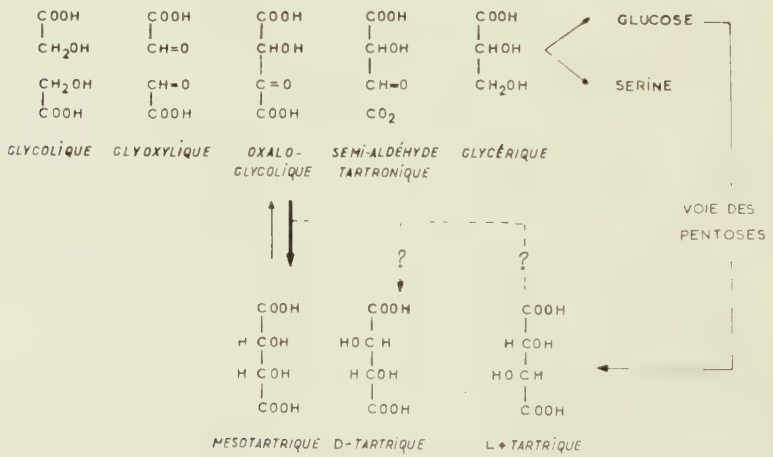
L'acide succinique repris par le cycle des acides tricarboxyliques aboutit à l'acide pyruvique qui permet des synthèses variées.

Dans les feuilles les enzymes qui catalysent les réactions du cycle glyoxylique existent en faible quantité. L'isocitrate et la maléate-synthétases sont néanmoins présentes dans le cytoplasme foliaire et même si le cycle de KREBS-KORNBERG ne joue

qu'un rôle secondaire, l'acide glycolique et son produit d'oxydation : l'acide glyoxylique, interviennent d'une manière notable dans la biosynthèse des amino-acides (glycine, sérine) et des sucres (glucose).

En effet les feuilles possèdent une glyoxylate-réductase et une glycolate-oxydase qui catalysent les réactions convertissant ces deux acides l'un en l'autre. La glycolate reductase joue un rôle dans la respiration des feuilles, même si son action ne s'accompagne pas d'une production appréciable de liaisons riches en énergie. On note, en effet, que la production d'acide glycolique est particulièrement importante lorsque la photosynthèse est fortement inhibée par des conditions défavorables de vie : basse pression du gaz carbonique, intoxication par les alcools. Cependant l'acide glyoxylique prend toujours une place importante dans la biosynthèse de nombreux amino-acides : sérine, glycocolle, alanine, arginine, histidine.

Par l'utilisation de précurseurs marqués au ^{11}C, MAROC (55, 56) a étudié chez *Pelargonium zonale* L. et chez les jeunes feuilles et les grappes vertes de la Vigne (*Vitis vinifera* L.), la biogénèse de l'acide tartrique. Deux mécanismes parallèles sont proposés pour expliquer la formation de cet acide-alcool. Le premier implique comme source le glucose ou le sorbose et aboutit, par la mise en jeu des enzymes de la voie des pentoses-phosphates, à l'acide L (+) tartrique. Le deuxième mécanisme envisage l'addition de deux molécules de glyoxylate, provenant de l'oxydation de l'acide glycolique, en un intermédiaire à 4 atomes de carbone : l'acide oxaloglycolique.



Ce dernier suit deux types de réactions : l'une de dégradation, avec formation de glycerate, qui est à l'origine de la synthèse de la sérine et du glucose, l'autre de réduction qui conduit à l'acide mesotartrique ou à un mélange d'acide racémique et d'acide gauche (D(-)tartrique). Dans ce cas une voie latérale inconnue aboutit à la conversion partielle en acide droit (L(+)tartrique).

E) Accumulation des acides organiques chez les végétaux

Une caractéristique particulière des végétaux réside dans l'accumulation de quantités importantes d'un ou de plusieurs acides organiques qui sont généralement les acides malique, citrique, isocitrique, oxalique, tartrique et succinique. Ces acides sont, pour la plupart, des intermédiaires du cycle de KREBS.

Dans les feuilles, cette accumulation n'est pas due à une paralysie du cycle mais à l'intervention de réactions diverses de carboxylation. Il faut noter que le cycle fonctionne normalement dans les graines et les racines. Une partie des acides formés dans la racine pouvant être transportée dans les feuilles (1). Par contre certains enzymes sont absents dans de nombreux fruits ce qui explique l'accumulation d'acides organiques tels que l'acide iso-citrique dans le fruit de la ronce (*Rubus fruticosus* L.), de l'acide citrique dans le citron (*Citrus limonum* Risso.) et de l'acide malique dans la pomme (*Pirus malus* L.).

MOYSE et JOLCHINE (47, 48, 59) ont indiqué un mécanisme probable permettant d'expliquer l'accumulation des acides malique et citrique dans les feuilles de Crassulacées. Le mécanisme proposé est illustré dans la figure n° 5.

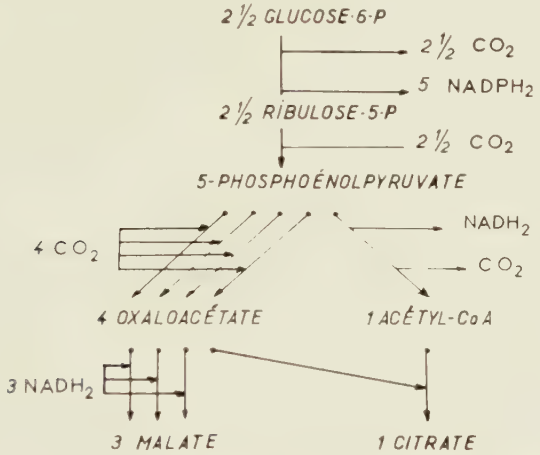


FIG. N° 5. — Schéma des réactions permettant d'expliquer l'accumulation des acides citrique et malique chez les Crassulacées (MOYSE et JOLCHINE).

Ceci permet d'interpréter le fait qu'en atmosphère de gaz carbonique 3 molécules d'acide malique sont stockées à côté d'une seule molécule d'acide citrique. Cette interprétation peut être étendue à d'autres végétaux et en particulier au tabac (52).

L'accumulation de l'acide oxalique a été longtemps considérée comme liée soit au métabolisme des glucides (88), soit au métabolisme des amino-acides (83). Quoi qu'il en soit cet acide provient

de l'oxydation de l'acide glycolique. Pour expliquer la formation importante de ce dernier chez *Begonia semperflorens*, Lonk et Otto, TAVANT (90) formule deux hypothèses. La première convient pour expliquer la génèse de l'acide à l'obscurité. L'acide glycolique proviendrait de l'acide-citrique sous l'action de l'isocitratelyase : dans ces conditions, il se formerait simultanément du glyoxylate et du succinate. Une partie de l'acide glycolique serait oxydée en oxalate. La plus grande vitesse de génèse de l'oxalate à la lumière s'expliquerait par une deuxième voie. L'acide glycolique serait libéré au cours de transfert de transcetolisation concernant le cycle de CALVIN lors de la régénération du ribulose-diphosphate à partir des hexoses et des trioses phosphates.

En conclusion on voit que les acides organiques participent d'une manière complexe à l'économie du végétal supérieur. L'assimilation chlorophylienne, par la fixation du gaz carbonique, conduit à l'élaboration de molécules acides à partir desquelles sont synthétisés les constituants de la matière végétale. Cependant ces mêmes acides proviennent aussi du métabolisme des substances qu'ils ont permis d'élaborer. Ils sont également impliqués dans les cycles de dégradation qui régénèrent le gaz carbonique et fournissent les liaisons chimiques constituant l'énergie utilisable par la cellule. Leur présence est le résultat d'un équilibre dynamique.

Mais à côté de ces possibilités réactionnelles, certains acides sont des composés quantitativement importants de la matière organique du végétal. Le stockage préférentiel de certains d'entre eux procède pour la plupart du temps de la mise en œuvre de biosynthèses parallèles à la voie classique, faisant partie de processus normaux chez un végétal défini ou d'un processus de défense. On peut alors envisager une accumulation correspondant à un phénomène de détoxication.

On peut également envisager ce stockage comme un mécanisme aboutissant à la formation de réserves pour une utilisation ultérieure. Chez les fruits, par contre, cette accumulation résulte de l'absence de système de dégradation.

Equilibre dynamique et accumulation préférentielle sont donc les deux modes expliquant la présence qualitative et quantitative des divers acides organiques dans le règne végétal.

II. — TECHNIQUES ANALYTIQUES RELATIVES A L'IDENTIFICATION ET AUX DOSAGES DES ACIDES ORGANIQUES DES VEGETAUX

A) Extraction

L'isolement des acides organiques aliphatiques à chaînes courtes présents dans les végétaux nécessite plusieurs étapes comprenant l'extraction et la purification des extraits.

L'extraction des acides organiques pose comme problème initial celui du traitement du végétal dès la récolte, car les systèmes enzymatiques présents dans les cellules sont susceptibles de dégrader les acides. On opèrera sur le végétal fraîchement cueilli ou après sa stabilisation (par l'alcool bouillant ou par congélation), ce qui inhibe les enzymes. On peut aussi effectuer la dessication (liophylisation, séchage à la température ordinaire ou à chaud, en présence ou en l'absence de déshydratant, à la pression atmosphérique ou sous pression réduite). La dessication a pour but d'éviter les dégradations enzymatiques mais aussi d'éliminer l'eau cellulaire qui représente environ 90 p. 100 du matériel frais. La technique choisie doit être non agressive et rapide afin de ne pas aboutir à des pertes et des modifications par décarboxylation, transamination non enzymatique, isomérisation ou par des réactions plus ou moins complexes comme par exemple celle s'effectuant à une température de 70°C entre les acides alcools et certains composés réducteurs (fructose, acide ascorbique...).

Les acides organiques se divisent en composés mono, di- et tricarboxyliques, la chaîne étant saturée ou éthylénique, des fonctions alcools ou cétones peuvent accompagner la ou les fonctions acides. Il s'ensuit que la solubilité de ces corps et celle de leurs sels varie en fonction du nombre de groupements carboxyliques, de la longueur et de la nature de la chaîne et des groupements fonctionnels autres que la fonction acide. Il n'est pas possible de donner des règles générales de solubilité, les cas les plus divers étant rencontrés dans la pratique. Le solvant d'extraction le plus usité est l'eau. Cette opération se fait en milieu acide ou en milieu alcalin (45) ; le pH basique est surtout utilisé pour éviter les pertes en acide oxalacétique. On s'adresse aussi aux solvants organiques (éther, alcool (7), benzène...) Les acides libres sont plus ou moins solubles dans ces solvants, les sels ne l'étant pas la plupart du temps.

On dispose de quatre procédés pour purifier les extraits bruts aqueux : précipitation ou absorption des substances gênantes, pré-

cipitation des acides sous forme de sels insolubles, extraction au moyen de solvants organiques convenables et mise en œuvre des résines échangeuses d'ions.

Les protéines, les matières pectiques et mucilagineuses ainsi que certains polysaccharides peuvent être précipités par l'acide métaphosphorique, l'acide tungstique ou l'acide tri-chloracétique. Les oses simples sont absorbés sur le complexe cuivre-chaux.

La précipitation des acides organiques se fait sous forme de leurs sels de plomb lorsqu'ils sont en solution aqueuse et sous forme de leurs sels de baryum lorsqu'ils sont en solution alcoolique. Les acides sont ensuite libérés par l'hydrogène sulfuré ou l'acide sulfurique. Les sels de zinc, de calcium, de baryum, de cuivre et d'argent ont des coefficients de solubilité différents, ce qui peut être mis à profit pour isoler certains acides organiques. C'est ainsi que l'on purifie l'acide lactique sous forme de son sel de zinc (6, 14). Le sel de calcium de l'acide oxalyque est insoluble dans l'eau alors que les sels de ce métal des autres acides sont, en règle générale, solubles. Le tartrate de potassium est peu soluble en milieu aqueux, le tartrate de calcium est le seul sel calcique des acides hydroxylés insoluble dans l'éthanol. Par contre les sels de baryum des acides mono-carboxyliques sont solubles en milieu alcoolique.

L'extraction des acides de leur solution aqueuse est parfois réalisée au moyen d'éther, bien que cette opération soit particulièrement difficile pour l'acide pyruvique et même impossible pour l'acide tartrique. Par contre l'éther dissout certains acides minéraux (acide nitrique) (21).

A l'heure actuelle la mise en œuvre des résines échangeuses d'ions constitue le procédé de choix pour la purification des extraits végétaux (15). L'opération est menée en plusieurs étapes. Les solutions d'extraction transitent tout d'abord à travers une résine cationique qui retient les ions minéraux et les composés alcalins. L'effluent acide est admis sur une colonne de résine anionique qui fixe les acides et qui laisse passer les composés neutres (sucres, etc...). Les acides sont élués par une solution alcaline de soude ou de carbonate de sodium. La solution des sels de sodium est versée sur une colonne de résine cationique qui fixe les ions métalliques. L'effluent ne contient plus que les acides organiques libres et les acides minéraux.

B) Méthodes de séparation et d'identification

Lorsque l'on a isolé et convenablement purifié la totalité des acides organiques présents dans le matériel végétal il est nécessaire d'effectuer la séparation des composants avant de les identifier et de les doser. On connaît depuis longtemps des procédés analytiques basés sur la solubilité différentielle des sels de calcium (DRAGENDORFF (3, 4)). A ces techniques furent substitués des procédés reposant sur la distillation fractionnée des esters méthyliques (11, 71). Ce procédé n'est convenable que si l'on dispose

d'une quantité notable de matériel, la précision des résultats dépend de l'efficacité des colonnes à distiller.

L'introduction des méthodes chromatographiques à pouvoir de résolution élevé, et qui permettent d'opérer sur des quantités plus faibles de substances, a été un apport considérable dans l'analyse des acides organiques (76, 100).

Au point de vue technique la chromatographie est mise en œuvre soit sur colonne (chromatographie liquide-liquide, chromatographie solide-liquide, chromatographie liquide-gaz) soit sur un support papier ou couche mince de phase solide recouvrant une plaque de verre, de fibre de verre, d'aluminium ou de matière plastique.

1) CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

a) *Chromatographie par échange d'ions*

Les résines échangeuses d'ions sont très utilisées pour séparer le totum des acides organiques des composés neutres ou alcalins qui les accompagnent dans les extraits végétaux. Elles sont moins utilisées pour l'analyse des mélanges complexes d'acides organiques. Les résines anioniques sont employées soit sous forme libre (hydroxyle) soit sous forme salifiée (carbonate, formiate). Les acides absorbés sont élués par des solutions alcalines (soude, carbonate de sodium) ou acides (acide chlorhydrique, acide formique). La qualité de la séparation dépend de la nature de la résine et des valeurs des pK des acides étudiés. Les acides organiques ont des forces différentes : certains sont des acides forts (acide malique, acide citrique), d'autres sont des acides faibles (acide glycolique, acide lactique). Un type de résine ne pourra pas assurer une résolution complète d'un mélange complexe. Il faut noter également les difficultés rencontrées pour l'analyse des effluents. Les acides organiques se trouvent en solutions riches en ions minéraux et de ce fait il faut éliminer ceux-ci pour doser et caractériser les composés organiques dans les différentes fractions recueillies soit par passage sur une nouvelle résine cationique, soit par dessalage électrolytique, soit enfin par distillation sous vide si l'on a affaire à un composé volatil (acide chlorhydrique, acide formique).

BUSCH et coll. (17) utilisent le Dowex-1 sous forme formiate : l'élution est assurée par une solution d'acide formique variant régulièrement de concentration (0,1 N à 5 N). Les fractions sont placées sous vide en présence de soude afin de chasser l'acide volatil et pouvoir doser les acides fixes. OWENS et coll. (66) préconisent la permutite S comme phase stationnaire et une solution 0,08 N d'acide chlorhydrique comme phase mobile. L'analyse qualitative des acides dans les fractions de l'effluent est faite par chromatographie sur papier. SAMUELSON et JOHNARD (85) ont séparé l'acide glycolique et l'acide lactique sur une colonne de Dowex-1 (acétate) au moyen d'une solution 0,05 M d'acétate de cui-

vre. L'effluent est analysé automatiquement au moyen d'une solution de thiosulfate. Le Dowex-2 et le Dowex-3 ont été mis en œuvre par BERNTSSON et SAMUELSON (12).

b) *Chromatographie sur gel de silice*

La chromatographie de partage sur gel de silice a été proposée pour la première fois par ISHERWOOD (46). Le gel de silice est le support de la phase aqueuse acide, la phase mobile est constituée de différents mélanges de chloroforme et de n-butanol ou de chloroforme et de ter-amylol, équilibrés avec une solution diluée d'acide sulfurique. De très nombreuses modifications ont été apportées à la méthode originale (16). C'est ainsi que RAVEUX et BOVE (78) ont pu réaliser en 1957 une étude critique de 15 méthodes différentes proposées à cette date. Elles se différencient par le diamètre et la longueur de la colonne, l'origine de la silice, la quantité de celle-ci mise en œuvre et son degré d'hydratation, le volume et la composition de la phase aqueuse en équilibre. Ces auteurs proposent une technique personnelle basée sur leurs nombreuses observations et l'appliquent à la détermination des acides organiques du tissu de topinambour et des cultures de tissu de *citrus* (17). En 1956, JOLCHINE (47) a décrit une méthode analogue et étudié les acides organiques de *B. daugremontianum*, Berger. L'analyse des effluents est réalisée par dosage acidimétrique au moyen d'une solution 0,01 N de soude en présence de rouge de phénol et d'un agent tensio-actif (solution à 1 p. 100 de lauryl-sulfonate) qui permet de faciliter le contact entre l'éluant organique et la solution aqueuse de titrage.

c) *Chromatographie sur Celite*

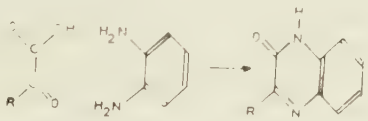
STUZ et BURRIS (89) en 1951, puis PHARES et coll. (70) en 1952, utilisent comme phase stationnaire la Celite 545. Le principe général de l'opération est identique à celui de l'utilisation du gel de silice. CARLE et ALQUIER-BOUFFARD (22) proposent la Celite 535 (John Manville).

La Celite présente certains avantages sur le gel de silice. Les différents échantillons sont plus homogènes et conduisent à des résultats plus reproductibles. L'efficacité est plus élevée ce qui permet d'utiliser des colonnes plus courtes et donc de réduire notablement la durée de la séparation. CARLES (20) a récemment proposé l'automatisation de cette technique. Un programmateur horaire permet de faire passer ou d'interrompre aux heures prévues les solvants successifs à admettre au sommet de la colonne. Une pompe branchée à la sortie de celle-ci régularise le débit de l'effluent. Les acides sont extraits de la phase organique au moyen d'un tampon convenable et les variations de l'acidité sont alors dosées automatiquement, soit par une méthode colorimétrique, soit au moyen d'un pHmètre enregistreur.

d) *Chromatographie en phase gazeuse*

La plupart des acides organiques polyfonctionnels ne se prêtent pas directement à la séparation par chromatographie en phase gazeuse. On les sépare sous forme de leurs esters méthyliques. Cette technique a été décrite pour la pemière fois par GEE (36). L'estérification à l'échelle micro-préparative présente certaines difficultés. L'estérification par le diazométhane est facilement réalisable pour les acides dicarboxyliques (BARTSCH et coll. (9)). Par contre, les acides hydroxylés, cétoniques, di et tri-carboxyliques s'estérifient incomplètement ou donnent des réactions secondaires avec le diazométhane ou les mélanges méthanol : acide minéral. GEE propose l'emploi d'une solution à 5 à 10 p. 100 d'acide chlorhydrique dans le méthanol en présence de chlorure de thionyle comme catalyseur. L'estérification totale est obtenue sous reflux en 10 minutes. La colonne de séparation de 2,5 pieds de long et de 1/8 de pouce de diamètre est remplie de Chromosorb W (100-200 mesh) imprégné de 5 p. 100 de néopentylsuccinate. La température de travail est programmée (6°C/mn) entre 64° et 186°C. Le gaz vecteur est l'Helium (50 ml-mn) et le détecteur, à ionisation de flamme. Ce procédé conduit à une excellente résolution des acides organiques couramment rencontrés dans les végétaux. RONKAINEN (81) décrit la préparation des esters méthyliques des acides cétoniques par action du diazométhane sur les 2,4-dinitrophénylhydrazone des acides suivie de la libération de l'ester par élimination de la copule azotée au moyen de l'ozone.

En ce qui concerne l'acide pyruvique et l'acide α-cétoglutarique HOFFMAN et KILLINGER (43) préconisent la chromatographie des dérivés triméthylsilylés des quinoxalinols obtenus par action des acides cétoniques sur l'O-phénylènediamine.



La séparation est réalisée sur une colonne de 6 pieds de Chromosorb W imprégné de 13 p. 100 de silicone SE-30 ou de 1 p. 100 de OV-17. La température de travail est programmée entre 100° et 200° en raison des très grandes différences existant entre les volumes de rétention des deux composés étudiés.

2) CHROMATOGRAPHIE SUR SUPPORT

a) *Chromatographie sur papier*

Il n'est pas possible de donner une analyse exhaustive des très nombreuses techniques proposées pour la séparation et pour

l'identification des acides organiques par chromatographie sur papier (23). Disons seulement que les solvants mis en œuvre se divisent en deux groupes : les solvants acides utilisés en chromatographie descendante et les solvants alcalins utilisés par la technique ascendante. Les solvants acides sont généralement composés de n-butanol et d'acide formique, les alcalins d'éthanol et d'ammoniaque.

La révélation des acides sur le document se fait, après élimination totale du solvant, au moyen d'une solution alcoolique d'un indicateur coloré de pH (bleu de bromocrésol, le plus souvent). Différents réactifs plus ou moins spécifiques sont proposés : aniline/glucose, nitrate d'argent ammoniacal, ferrocyanure et ferricyanure de potassium, vanadate d'ammonium, anhydride acétique/pyridine, molybdate d'ammonium/acide perchlorique, naphtorésorcinol, perchlorure de fer, chlorhydrate d'hydroxylamine/perchlorure de fer, 2,6-dichlorophénol-indophénol, quinine... (23, 24, 93, 98).

On peut également soumettre à la chromatographie sur papier les 2,4-dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques (pyruvique et α-cétoglutarique) (JOLCHINE (47), SAINI (84)) ou leurs nitroquinoxalones (COWARD et SMITH (27)).

b) *Chromatographie sur couches minces*

Décrite pour la première fois, en 1952, par BRAUN et GRENEN (13) et par PETROWITZ et PASTUSKA (69), la chromatographie sur couche mince est une transposition, le plus généralement, de la chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant ici le Silicagel (54, 75, 92) et de la chromatographie sur papier par l'emploi de couches minces de poudre de cellulose (5, 10, 30, 41, 51, 60, 77, 86). Les solvants sont analogues. Des phases plus spéciales ont été également proposées : mélange de Kieselgel et de Silicagel (3 : 1) (57), couche mince de polyéthylèneglycol (49). Les impuretés métalliques et autres du Kieselgel commercial doivent être soigneusement éliminées afin d'améliorer la qualité des séparations (67).

Les acides organiques ou leurs dérivés : 2,4-dinitrophénylhydrazones (28, 39, 99) et dérivés des Rhodanines (79), 2, 4-dinitrophénylhydrazides (91) sont aussi séparés. La chromatographie sur couche mince a été combinée à d'autres méthodes de séparation : chromatographie en phase gazeuse (RONKAINEN (80)) et électrophorèse (NYGAARD (64)).

C) METHODES SPECIFIQUES D'IDENTIFICATION ET DE DOSAGE

Les méthodes que nous venons brièvement de rappeler sont particulièrement intéressantes lorsqu'on désire étudier la répartition de l'ensemble des acides organiques du végétal. Or l'accumulation de certains constituants acides rend difficile l'identification

et le dosage de ceux qui ne sont présents qu'en faibles proportions. Aussi pour l'étude d'un seul acide de cette nature fait-on appel à des méthodes spécifiqeus.

1) *Méthodes chimiques*

La mise en œuvre des techniques spécifiques a été pendant longtemps la règle générale, chaque acide étant dosé par un procédé analytique qui lui est propre.

Les premières méthodes de dosage décrites étaient basées sur la détermination gravimétrique d'un sel insoluble. Elles nécessitent des étapes de purification longues et délicates (100), et outre les sels de calcium, mettent en jeu les sels de barym, de zinc, de cuivre, du complexe cuivre-pyridine etc... ainsi que l'extraction préliminaire par des solvants organiques. La plupart de ces procédés ont été modifiés afin que le dosage final soit une méthode colorimétrique plus sensible et plus spécifique.

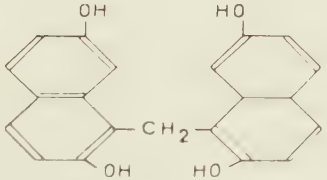
Les procédés colorimétriques se classent en deux groupes selon que l'on désire doser les acides-alcools et l'acide oxalique ou les acides-cétoniques.

Les méthodes qui permettent le dosage des acides-alcools sont basés sur la transformation de ces composés en milieu sulfurique, en aldéhydes, selon l'équation suivante :

$$R\text{-}CH(OH)\text{-}COOH \longrightarrow R\text{-}CH = O + CO + H_2O$$

Les aldéhydes sont condensés dans le milieu réactionnel avec un polyphénol.

DENIGES a montré (29) dès 1909, la formation de formaldéhyde à partir de l'*acide glycolique*. L'aldéhyde réagit avec le 2,7 dihydroxynaphtalène (34) pour donner le 2,2', 7,7'-tetrahydroxy, 1,1'-dinaphtylméthane de coloration rouge violet (λm = 570 mμ) (19, 37).



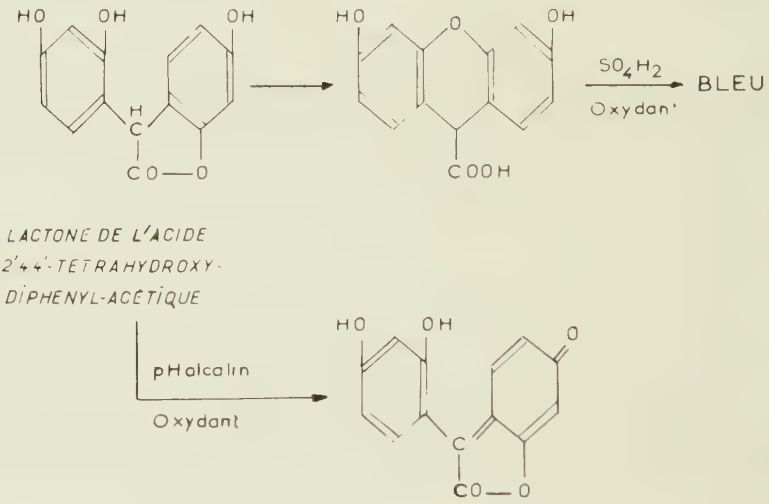
2.2'.7.7'-TETRAHYDROXY-1.1'-DINAPHTYL-METHANE

L'acide lactique, dans des conditions voisines, conduit à l'acétaldéhyde que l'on condense avec différents phénols (gaïacol, hydroquinone, α-naphtol) mais surtout avec le p.hydroxydiphényle (44, 65). Dans ce dernier cas on obtient un chromogène violet (λm = 570 mμ).

La classique réaction de MOLHER (58) consiste à chauffer l'*acide tartrique* avec une solution sulfurique de résorcinol. Cette

réaction est positive avec de nombreux acides hydroxylés : l'*acide glycérique*, *acide tartronique* et *acide malique*. L'*acide tartrique* est dosé après avoir été transformé en pentabromacétone par action du brome et du permanganate de potassium. La cétone halogénée réagit avec les phénols (β-naphtol) comme l'aldéhyde qui proviendrait de sa saponification et de sa décarboxylation.

L'acide oxalique peut être déterminé d'une manière semblable après sa réduction en acide alcool (*glycolique*) ou acide aldehyde (*glyoxalique*). C'est ainsi que l'action du magnésium en milieu acide le transforme en acide glycolique qui est dosé comme il vient d'être dit. Les réducteurs plus doux (amalgame d'aluminium, couple zinc-cuivre) (68) fournissent de l'acide glyoxalique. En milieu acide ce dernier se condense avec le résorcinol pour donner la lactone de l'acide 2,2', 4,4'-tetrahydroxyphénylacétique.



En présence d'un oxydant et en milieu acide cette lactone se transforme en acide resoxalique qui dans ces conditions fournit un chromogène bleu. Par contre, en milieu alcalin la lactone s'oxyde en une quinone lactonique et la coloration bleue-violacée vire au pourpre, puis à l'orangé, tandis que se développe une fluorescence jaune-vert. Selon ce mode opératoire les aldéhydes autres que l'acide glyoxalique ne provoquent pas l'apparition d'une semblable coloration.

Nous rapprocherons de ces méthodes les techniques de dosage de l'acide malique et de l'acide succinique (2, 8) qui réagissent en milieu sulfurique avec le résorcinol pour fournir des dérivés de l'ombelliferone doués d'intenses fluorescences.

Les méthodes mises en œuvre pour doser les acides cétoniques sont basées sur la réactivité de la fonction cétonique qui permet en particulier d'obtenir des hydrazones. On prépare générale-

ment les 2,4-dinitrophénylhydrazones de l'acide pyruvique et de l'acide α-cétoglutarique de coloration rouge en milieu alcalin (50)

2) *Méthodes enzymatiques*

Certains acides organiques peuvent être dosés en utilisant des enzymes spécifiques. Les déterminations se font par mesure gazométrique de l'oxygène consommé ou du gaz carbonique libéré au cours de la réaction.

C'est ainsi que l'acide succinique sous l'action de la succinate-oxydase du cœur de Bœuf ou de Porc et en présence d'oxygène, conduit à l'acide fumarique selon l'équation :

$$HOOC\text{-}CH_2\text{-}CH(O)\text{-}COOH + 1/2\ O_2 \longrightarrow HOOC\text{-}CH = CH\text{-}COOH + H_2O$$

Le volume d'oxygène consommé est donc proportionnel à la quantité d'acide succinique présent dans le milieu (94).

La levure de boulangerie, qui contient la fumarase et la maléate-déshydrogénase, transforme l'acide fumarique en acide malique, lequel est décarboxylé selon :

$$HOOC\text{-}CH = CH\text{-}COOH + H_2O \rightarrow HOOC\text{-}CH_2\text{-}CH(OH)\text{-}COOH$$

$$HOOC\text{-}CH_2\text{-}CH(OH)\text{-}COOH \longrightarrow CH_3\text{-}CH(OH)\text{-}COOH + CO_2$$

L'acide malique est aussi décarboxylé par la malate-décarboxylase des cultures de *lactobacillus arabinosus* adapté à l'acide malique, selon la même équation que celle que nous venons de décrire. Il s'ensuit que la connaissance des volumes de gaz carbonique dégagé au cours de ces réactions permet de connaître les quantités d'acide fumarique et d'acide malique contenues dans les échantillons analysés (62, 63).

Nous rapprocherons de ces méthodes, celles relatives aux dosages des acides iso-citrique et cis-aconitique (HARGREAVES et coll. (40)) qui mettent en œuvre l'aconitase du cœur de Bœuf, bien qu'ici la méthode de dosage ne soit pas gazométrique, mais repose sur le dosage de l'acide citrique après sa transformation en pentabromacétone. Le milieu biologique contenant les trois acides : citrique, iso-citrique et cis-aconitique, est divisé en trois fractions. Sur la première on effectue le dosage de l'acide citrique, le deuxième échantillon est soumis à l'action de l'enzyme qui transforme l'acide cis-aconitique et l'acide iso-citrique en acide citrique. Sur le troisième échantillon on effectue l'isomérisation de l'acide cis-aconitique en acide trans-aconitique qui échappe à l'action ultérieure de l'aconitase. Ainsi la différence entre les quantités d'acide citrique trouvées dans le deuxième et le troisième essai permet de calculer la teneur de l'échantillon en acide cis-aconique, celle existant entre les quantités d'acide citrique contenus dans le troisième et le premier essai permet d'apprécier la teneur en acide iso-citrique.

Les données rassemblées sur la Chimie Analytique des acides organiques soulignent les difficultés rencontrées dans l'étude de ces substances. Les méthodes chromatographiques qui se sont particulièrement développées ces dernières années permettent la séparation, l'identification et le dosage de mélanges d'acides organiques. Il n'en demeure pas moins qu'en ce qui concerne l'extraction du matériel végétal, le dosage et l'identification de faibles quantités d'acides en présence de teneurs élevées en d'autres dérivés carboxyliques, posent aux chimistes des problèmes particuliers qui ne peuvent être résolus au moyen d'une méthodologie systématique.

OBJET DU TRAVAIL

Il ressort de la brève revue bibliographique que nous avons exposée que si des méthodes nombreuses et variées ont été décrites, pour l'identification et le dosage des acides aliphatiques polyfonctionnels à chaînes courtes, celles qui apparaissent les plus satisfaisantes sont récentes.

Certains problèmes d'extraction demeurent dans le cadre général, encore mal explorées.

Aussi nous sommes-nous proposée, tout d'abord, d'éprouver au Laboratoire, un ensemble de techniques permettant d'identifier et de doser les acides organiques chez les végétaux. Dans un deuxième temps nous avons appliqué cette méthode à l'étude de l'influence de certains facteurs de stabilisation (alcool, dessication par la chaleur) sur la composition en acides organiques d'un végétal bien étudié : le *Bryophyllum daigremontianum* Berger et comparé nos résultats avec ceux obtenus par analyse du suc cellulaire provenant de l'expression du végétal frais.

Dans un troisième temps nous avons cherché à préciser la composition en acides organiques de divers végétaux réputés stocker certains acides particuliers : acide iso-citrique chez trois Crassulacées (*B. daigremontianum* Berger - *B. calycinum* Salisb. - *B. crenatum* Baker) ; l'acide succinique chez une Ombellifère (*Daucus carota* L.) ; l'acide glycolique chez une Ampélidacée (*Ampelopsis hederacea,* Michx.) et l'acide oxalique chez une Polygonacée (*Rumex acetosa* L.)

C'est l'ensemble des méthodes mises en œuvre et de nos résultats expérimentaux que nous décrirons successivement.

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE PREMIER

MATERIEL ET TECHNIQUES

I. — MATERIEL VEGETAL

A) *Traitement des végétaux frais*

Nous avons disposé des feuilles fraîches de *Bryophyllum daigremontianum* Berger, de Vigne Vierge (*Ampelopsis hederacea* Michx, d'oseille (*Rumex acetosa* L.), des feuilles et des racines de carotte (*Daucus carota* L.). Nous avons exprimé les végétaux à la presse et nous avons recueilli le suc cellulaire. Pour cela nous disposons d'un bol cylindrique, en acier inoxydable, de 8 cm de haut et de 9 cm de diamètre. Un petit tube d'évacuation est placé latéralement au bas du récipient. On dispose au fond du bol un disque d'acier, de même diamètre que le diamètre interne du bol, disque muni d'environ 360 trous carrés de 4 mm2. Au-dessus de ce disque, on place une couche de feuilles, puis un disque d'acier identique au précédent. On dispose ainsi 5 couches de feuilles et 5 disques d'acier. Au-dessus on place un disque plein qui servira de piston.

L'ensemble est mis sous une presse hydraulique et on applique une pression de 4 tonnes/cm2. On recueille le suc qui s'écoule par le tube d'évacuation. Le suc est centrifugé (15.000 T/mn). C'est la liqueur ainsi préparée qui est soumise à l'analyse.

En ce qui concerne les racines de carottes nous les avons tout d'abord réduites en copeaux au moyen d'une rape électrique de ménage et ensuite exprimées selon la technique qui vient d'être décrite.

B) *Traitement des végétaux secs*

Les feuilles de *B. calycinum* Salisb. et de *B. crenatum* Baker, ont été séchées sur le lieu de la récolte (Bouaké (Côte d'Ivoire),

Ouagadougou (Haute-Volta), Bamako (Mali)). Elles ont été pulvérisées au Laboratoire (WARING blendor) puis mises en suspension dans 5 fois leur poids d'eau distillée. Après une nuit de contact, sous agitation, à la température du Laboratoire, la préparation est portée à l'essoreuse centrifuge (COUPRIE) et la liqueur d'extraction récupérée.

Lorsque nous avons disposé de suffisamment de matériel (suc cellulaire ou liqueur d'extraction), nous avons préparé des extraits secs au moyen d'un atomiseur de Laboratoire (A/S Nitro Atomizer (Copenhague)). La vitesse d'évaporation est de 1,5 litres par heure avec une température d'entrée d'air de 150°C et une température de sortie de 80°C.

II. — TECHNIQUES ANALYTIQUES

A) *Teneur en eau, cendres et matières minérales*

La teneur en eau a été déterminée par dessication à poids constant, dans l'étude à 105°, d'une prise d'essai exactement pesée, voisine de 5 g. La perte de poids nous a permis de calculer le taux d'humidité de l'échantillon.

Nous avons également déterminé l'extrait sec de chaque liqueur d'extraction (suc cellulaire et liqueur de macération). Pour cela nous avons placé 10 ml de solution dans une capsule de platine tarée et porté le tout à l'étuve à 100°C jusqu'à poids constant du résidu d'évaporation.

A partir des échantillons secs, le taux de cendres a été déterminé par calcination sur un bec Bunsen, dans le creuset de platine jusqu'à obtention de cendres blanches, en s'aidant éventuellement de quelques gouttes de solution concentrée d'eau oxygénée à 110 volumes. Le résidu est pesé après refroidissement dans un dessicateur.

Les cendres ont été dissoutes dans un volume connu de solution N d'acide chlorhydrique (généralement 100 ml). Sur des dilutions convenables nous avons dosé les ions *sodium* et *potassium* par photométrie de flamme. Le *calcium* a été dosé par manganimétrie, après précipitation en milieu acétique, sous forme d'oxalate, selon la méthode classique.

Les ions *chlorures* ont été dosés sur les extraits aqueux, après destruction de la matière organique par oxydation en milieu nitrique au moyen du permanganate de potassium, par argentimétrie selon la classique méthode de RUZNIAK.

B) *Dosage des sucres réducteurs*

Les sucres réducteurs totaux ont été dosés par la méthode de HAGEDORN-JENSEN (38) après défécation des extraits aqueux par l'hydroxyde de cadmium selon DUMAZERT (32).

C) *Détermination de l'acidité totale*

L'acidité totale a été déterminée par passage d'un volume connu de l'extrait aqueux sur une résine échangeuse d'ions : Amberlite IRC-50 (0,4 - 0,5 mm) (capacité d'échange 1,1 mEq/g). Pour cela on place 10 g de résine humide, convenablement activée dans une colonne de verre de 10 mm de diamètre et de 25 cm de haut. Le débit de passage de l'extrait est fixé à 1 ml/mn au moyen d'une pompe péristaltique. Lorsque la totalité de l'extrait a transité dans la colonne on lave celle-ci au moyen d'eau distillée jusqu'à ce que l'effluent ait un pH voisin de la neutralité. On rassemble la totalité de l'effluent, on porte à volume connu. Sur une fraction aliquote de cette liqueur on détermine l'acidité au moyen d'une solution 0,1 N de soude en présence de phénolphtaléine comme indicateur de virage.

D) *Dosage de l'acide oxalique*

En raison de la présence dans les végétaux d'une quantité notable d'ions calcium qui insolubilisent l'acide oxalique nous avons dosé cet acide directement sur le matériel végétal selon une technique inspirée de CARLES et ALQUIER-BOUFFARD (22). Pour cela on broie une prise d'essai exactement pesée, voisine de 20 g de feuilles fraîches, en présence de 60 ml d'eau distillée et de 20 ml de solution concentrée d'acide chlorhydrique (ULTRA-TURRAX). La préparation est portée une minute à l'ébullition puis refroidie et centrifugée (15.000 T min.). La liqueur recueillie, le culot de centrifugation est lavé avec quelques millilitres de solution 2N d'acide chlorhydrique. Les solution acides sont rassemblées, portées à 100 ml au moyen de la solution 2N d'acide chlorhydrique.

On place dans un tube à centrifuger de forme conique et de 50 ml de capacité une prise d'essai convenable (20 ml généralement). On neutralise la solution au moyen de solution concentrée d'ammoniaque, en présence de rouge de méthyle comme indicateur interne. On ajoute alors 2 ml d'acide acétique pur et on porte la préparation au bain-marie bouillant pendant quelques minutes. On verse à chaud, 2 ml de solution 2N de chlorure de calcium. On abandonne l'essai à la température du laboratoire pendant 5 à 6 heures afin que se forme le précipité d'oxalate de calcium. On centrifuge, lave le précipité par quelques millilitres de solution à 2 p. 100 d'acide acétique, on dissout l'oxalate de calcium dans une solution à 50 p. 100 d'acide phosphorique et on dose l'ion oxalique par permanganimétrie selon la méthode classique.

III. — SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES ORGANIQUES

A) *Extraction des acides organiques*

Nous avons utilisé une technique d'extraction inspirée de celle proposée par JOLCHINE (47).

Une prise d'essai de l'extrait aqueux ou du suc d'expression, contenant approximativement 10 mEq acide, est passé à travers une colonne de verre de 10 mm de diamètre et de 25 ml de haut, contenant 25 g d'Amberlite IRA-401 (0,4 - 0,5 mm) (capacité d'échange 1 MEq/g). Le débit de passage de la liqueur est de 1 ml/mn. On lave alors la résine avec de l'eau distillée jusqu'à ce que l'effluent soit neutre. On admet alors au sommet de la colonne une solution 2N de soude. On recueille l'éluat alcalin par fractions de 10 ml, soit environ 15 à 20 fractions. Chacune d'elles est admise au sommet d'une colonne de verre de 10 mm de diamètre et de 25 cm de haut, contenant 10 g d'Amberlite IRC-120. On lave les colonnes jusqu'à ce que les effluents soient neutres au papier de tournesol. Chaque fraction est portée à un volume de 50 ml. Sur une prise d'essai de 1 ml de chaque liqueur on détermine l'acidité au moyen d'une solution 0,01N de soude en présence de phénolphtaléine comme indicateur.

On suit ainsi l'élution des acides organiques de la colonne anionique. Lorsque la totalité de l'acidité a été ainsi récupérée on rassemble les liqueurs et on évapore sous vide à une température n'excédant par 40°C et ce, jusqu'à ce que l'on obtienne un volume liquide de 20 ml environ. Cette solution est transvasée dans une petite capsule de verre avec les eaux de lavage du ballon dans lequel s'est effectuée l'opération. Le tout est porté à l'étuve à 37°C jusqu'à obtention d'un résidu sec ce qui nécessite environ 4 à 5 jours.

B) *Chromatographie sur colonne de célite*

a) *Mode opératoire.* — Nous avons adopté, à quelques détails près, la méthode décrite par CARLES et ALQUIER-BOUFFARD (65).

On utilise une colonne de verre de 20 cm de long et de 8mm de diamètre intérieur, munie à sa base d'un robinet et à son sommet d'un rodage auquel peut venir s'adapter une ampoule à brome de 100 ml de capacité (voir Figure n° 6). La phase stationnaire, est constituée de Célite 535 (Johns-Manville - Grosdemouge, 63, rue Parmentier, Paris), lavée plusieurs fois à l'éther sulfurique anhydre. On pèse 2 g de Célite ainsi préparée dans un erlenmeyer bouché avec un bouchon résistant aux solvants organiques (téflon). On ajoute en plusieurs fois 1,5 ml de solution 0,5N d'acide sulfurique en secouant de manière à ce que l'ensemble soit également humecté et n'adhère plus aux parois. On verse alors 40 ml de chloroforme en agitant jusqu'à ce que la Célite soit parfaitement mouillée par le solvant. On fait alors passer la phase stationnaire dans la colonne dont le fond est muni d'un petit tampon de coton de verre. On tasse légèrement la Célite, d'une manière très homogène, par petits mouvements de va-et-vient d'un agitateur de verre de diamètre très voisin de celui du diamètre intérieur de la colonne, de manière à ce qu'il agisse comme piston.

Dans un petit cristallisoir taré on pèse exactement de 5 à 10 mg d'acides organiques. Sur cette prise d'essai on verse 0,15 ml de solution 5N d'acide sulfurique pour dissoudre les acides. On ajoute 0,3 g de Célite et on homogénéise au moyen d'une petite baguette de verre, puis on ajoute quelques ml de chloroforme qui vont permettre de transvaser la préparation au sommet de la colonne. On tasse convenablement et on fixe la Célite au moyen d'un petit disque de papier filtre et d'un tampon de coton de verre, de manière à protéger l'horizontalité de la surface supérieure.

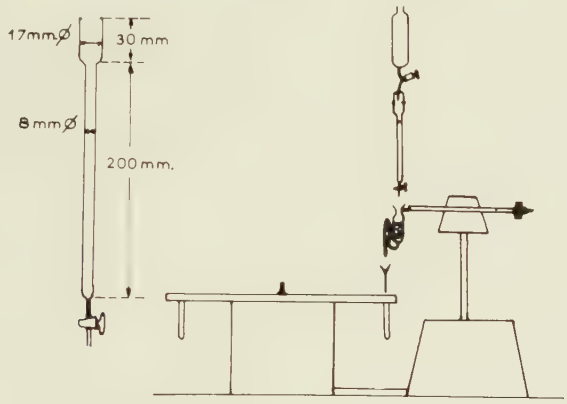


FIG. N° 6. — Dispositif pour la chromatographie des acides organiques sur Célite.

On dispose sous la colonne un collecteur de fractions (LKB) muni d'un dispositif de fractionnement à volume constant (prélèvements automatiques de 2 ml).

On admet alors les solvants au sommet de la colonne par l'intermédiaire de l'ampoule à brome qui a été adaptée au sommet. Les solvants sont préparés de la manière suivante :

Dans une série de 5 ampoules à décanter de 250 ml de capacité, on place respectivement : 7,5 - 12, 5 - 25 - 37,5 et 42,5 ml de n-butanol, puis 92,5 - 87,5 - 75 - 62,5 et 57,5 ml de chloroforme. A chaque préparation on ajoute 8 ml de solution 0,2 N d'acide sulfurique. On agite quelques minutes et on laisse reposer. On soutire les phases organiques qui constituent les solvants 1 - 2 - 3 - 4 et 5. Ceux-ci sont filtrés à travers un petit tampon de coton hydrophile afin d'éliminer toute trace d'eau en suspension. On fera passer au travers de la colonne, successivement, 40 ml de chacun des solvants dans l'ordre croissant en concentration de butanol.

L'acidité de chaque fraction est déterminée au moyen de l'appareil de titrage automatique TITRAVIT (Prolabo) (Sensibilité S 40) par une solution 0,01 N de soude. Chaque fraction est diluée avec environ 20 à 30 ml d'eau bidistillée et le tout transvasé dans le récipient de titrage. Nous avons vérifié que dans ces conditions l'acidité totale des acides carboxyliques est déterminée avec une précision de l'ordre de ± 2 p. 100. Cette technique a été choisie

afin d'éliminer le coefficient personnel d'appréciation du virage d'un indicateur et de réaliser ainsi des déterminations aussi régulièrement que possible.

b) *Expression des résultats.* — L'acidité de l'éluat recueilli dans un tube du collecteur est exprimée en micro Equivalent ($\mu Eg = 10^{-6}$ H). On construit un graphique en portant en ordonnées les valeurs ainsi déterminées et en abscisses les numéros correspondant des tubes collectés. La courbe correspondant au chromatogramme d'élution du mélange séparé.

Les volumes collectés étant égaux, la surface S-A du graphique, représentant la fraction A, défalquée de l'acidité du solvant d'élution (ligne de base), est proportionnelle à l'acidité qu'elle contient. Le rapport de cette surface S-A à la surface totale du chromatogramme S-T (S-T = S-A + S-B + S-C + S-X) multiplié par 100 est égal au pourcentage d'acidité de cette fraction A par rapport à l'acidité totale.

Lorsqu'une fraction n'est composée que d'un acide organique de P.M. = P, ayant n fonctions carboxyliques, si V est l'acidité totale du végétal (exprimée en mEq par gramme de matériel frais), la teneur de celui-ci en cet acide est égale à :

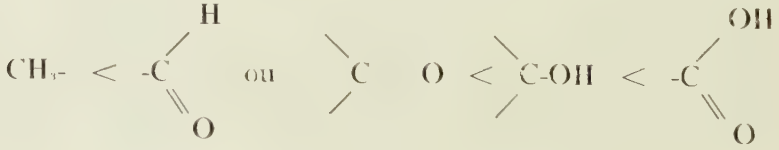
$$\frac{S\text{-}A}{S\text{-}T} \cdot 100 \cdot V \cdot \frac{P}{n} = X \text{ g d'acide pour 100 g de végétal frais.}$$

c) *Vérification de l'efficacité de la technique - Chromatographie d'acides organiques étalons.* — Nous avons soumis à la séparation chromatographique 30 acides organiques. La plupart de ces composés ont une origine commerciale (PROLABO, MERK, FLUKA, KOCH-LIGHT LABORATOR). Nous avons préparé par synthèse, 9 acides : acide pyruvique (26), acide succinique (26), acide adipique (26), acide itaconique (26), acide citraconique (26), acide mésaconique (26), acide tartronique (25), et acide glyoxalique (74).

Nous avons rassemblé nos résultats sous forme d'un graphique dans la figure n° 7, afin de préciser l'ordre d'élution des différents acides étudiés.

Les résultats de cette expérience montrent que :

— pour une même condensation en atomes de carbone les acides organiques possédant un deuxième groupement fonctionnel voient leurs volumes de rétention augmenter en fonction de la nature de ce groupement dans l'ordre :



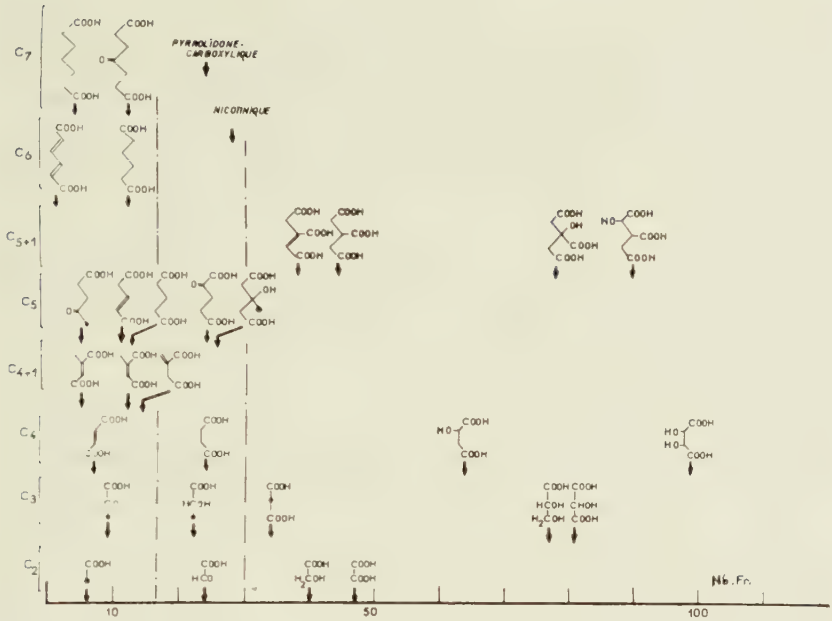


FIG. N° 7. — Ordre d'élution des acides organiques sur colonne de Célite, dans nos conditions opératoires.

— dans le cas des acides di-carboxyliques l'augmentation du nombre des atomes de la chaîne diminue la valeur du volume de rétention. C'est ainsi que l'ordre de sortie de la colonne est : acide adipique, acide pimélique, acide glutarique, acide succinique, acide malonique, acide oxalique.

IV. — IDENTIFICATION DES ACIDES ORGANIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Comme le montrent les résultats ci-dessus la chromatographie sur colonne ne permet pas de résoudre tous les mélanges d'acides organiques. Certains acides ont des volumes d'élution trop voisins pour qu'on puisse effectuer une séparation complète. Aussi est-il nécessaire de contrôler l'identité et la pureté des fractions, mises en évidence par chromatographie sur colonne, par une autre technique. Pour cela nous avons choisi de mettre en œuvre la chromatographie sur papier (23).

a) *Mode opératoire.* — Afin d'identifier l'acide ou les acides présents dans une fraction mise en évidence par chromatographie sur Celite on rassemble les liqueurs provenant du titrage des volumes d'éluat collectés représentant cette fraction. La liqueur neutre est admise au sommet d'une colonne de verre contenant 20 g d'Amberlite IRC-120 qui retient les ions sodium. L'éluat acide est

évaporé sous vide dans un appareil rotatif jusqu'à faible volume (10 ml environ), en maintenant la température de travail à une valeur de 40 C. La solution concentrée, transvasée dans une petite capsule de verre, est portée à l'étuve à 37°C jusqu'à obtention d'un résidu sec. Ce dernier est redissous dans un volume convenable d'eau (de 0,1 à 0,5 ml) et des fractions aliquotes de 10 µl à 50 µl sont soumises à la chromatographie sur papier.

b) *Technique.* — La chromatographie a été réalisée sur papier WHATMANN n° 1 au moyen de deux solvants : un solvant acide utilisé par voie descendante et un solvant alcalin mis en œuvre par voie ascendante.

Solvant acide n° 1 :

Butanol primaire	75 ml
Solution 25 N d'acide formique	15 ml
Eau distillée	10 ml

Solvant alcalin n° 2 :

Ethanol	80 ml
Solution d'ammoniaque (d = 0,92)	5 ml
Eau distillée	15 ml

Après le développement du chromatogramme, il est nécessaire d'éliminer toute trace de solvants acide ou alcalin qui pourrait imprégner le papier. Pour cela, on abandonne le document, pendant 24 heures, dans une enceinte convenablement ventilée.

La détection des acides est réalisée en règle générale au moyen de deux techniques :

a) On pulvérise sur le chromatogramme la solution de composition suivante :

Vert de bromocrésol	0,05 g
Alcool à 95°	100 ml

à cette solution alcoolique on ajoute, goutte à goutte, une solution 0,1 N de soude jusqu'à coloration verte franche sans reflet rouge par transparence.

Les acides organiques apparaissent en jaune sur fond vert.

b) On pulvérise sur le chromatogramme le réactif obtenu en faisant dissoudre 2 g de glucose et 2 ml d'aniline dans 20 ml d'eau distillée. On ajoute alors 20 ml d'alcool éthylique à 95° et 60 ml de n-butanol. Ce réactif doit être préparé extemporanément. Après pulvérisation on porte le document pendant 7 à 10 minutes dans une étuve réglée à 115°-120°C.

Les acides organiques apparaissent sous forme de taches brunes sur un fond blanc ou légèrement ocre.

c) *Expression des résultats.* — En raison des variations des valeurs absolues des Rf des acides organiques, dues à l'impossibilité de se trouver rigoureusement dans les mêmes conditions opératoires, nous avons pris comme valeurs du déplacement des composés les rapports entre les distances parcourues par les acides à la distance parcourue par un acide pris comme référence : l'acide malique. Chaque acide est donc caractérisé par son R-M. Nous avons rassemblé dans le tableau n° 1 les valeurs des R-M des acides organiques que nous avons étudiés dans les deux systèmes de solvants choisis.

TABLEAU N° 1. — Valeurs des R-M de différents acides organiques par chromatographie sur papier dans le système 1 : n-butanol : acide formique : eau (75 : 15 : 10) (v/v/v) et dans le système 2 : éthanol - ammoniaque : eau (80 : 5 : 15 (v/v/v).

Acides	*R-M dans solvant 1*	*R-M dans solvant 2*
Aconitique	1,54	0,65
Adipique	1,63	1,87
α-cétoglutarique	1,28	1,30
γ-cétopimélique	1,28	1,40
Citraconique	1,60	1,28
Citrique	0,84	0,57
Iso-Citrique	0,84	0,30
Férulique	1,76	1,53
Fumarique	1,78	0,58
Galactouronique	0,13	1,02
Glutaconique	1,61	1,50
Glutarique	1,58	1,53
3-OH, 3-Me, glutarique	1,46	—
Glycolique	1,15	2,70
Glyoxalique	1,40	0,34
Itaconique	1,76	1,41
Lactique	1,47	3,10
Levulique	1,66	3,30
Malique	1,00	1,00
Malonique	1.30	0,87
Mesaconique	1,82	1,30
Nicotinique	1,25	3,70
Oxalique	traînée	traînée
Pimélique	1,77	2,39
Pyrrolidone-carboxylique	2,95	3,08
Succinique	1,45	1,26
Tartrique	0,54	0,80
Tartronique	0,73	—
Tricarballylique	1.34	0,60

De l'examen des données rassemblées dans le tableau n° 1 il ressort que la chromatographie sur papier ne peut, à elle seule, permettre l'identification de tous les acides organiques. Par contre la mise en œuvre dans une première étape de la chromatographie sur colonne, suivie de l'analyse, par chromatographies sur papier à l'aide de deux solvants différents, des fractions issues de cette séparation, permet par la combinaison des deux procédés, de résoudre la plupart des mélanges complexes que l'on peut rencontrer chez les végétaux.

CHAPITRE II

LES ACIDES ORGANIQUES DE BRYOPHYLLUM DAIGREMONTIANUM, BERGER

Cette première partie de nos recherches a été consacrée à tester l'ensemble des méthodes d'analyse que nous venons de décrire d'une part et d'autre part de comparer les résultats que l'on peut obtenir par l'étude du suc d'expression du végétal frais et des extraits préparés à partir d'un échantillon stabilisé par l'éthanol ou desséché par la chaleur. Nous nous sommes adressés au *B. daigremontianum* Berger, dont la composition en acides organiques a été particulièrement bien définie par JOLCHINE (56).

Le *B. daigremontianum* Berger, a été cultivé dans les serres du Jardin Botanique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille (Service du Professeur F. PELLISSIER). Les feuilles ont été récoltées, avant le lever du soleil, à 5 h. du matin, en septembre 1967. La récolte a été divisée en trois lots :

— le premier lot de 2 kg, porté pendant 24 heures dans une étuve ventilée, réglée à 90°, nous a fourni 80 g de matière sèche.

— le deuxième lot (1,05 Kg) a été stabilisé dès la cueillette. Des fractions de 250 g ont été immergées dans 1.250 ml d'alcool bouillant pendant 30 minutes. Après ce temps les feuilles récupérées sont séchées pendant 48 heures à l'étuve à 40° afin d'éliminer totalement l'éthanol. Nous avons récupéré par cette technique 42 g de substance sèche.

— le troisième lot de 200 g a été exprimé à la presse et nous avons recueilli 187 ml de suc cellulaire, liquide légèrement visqueux, de couleur jaune-brun clair.

Le suc d'expression est directement soumis à l'analyse, par contre, en ce qui concerne les produits secs, nous avons extrait les acides par macération des drogues dans 5 fois leur poids d'eau distillée. Après 24 heures de contact, sous agitation, à la température du Laboratoire, nous avons récupéré les liqueurs par centrifugation et ce sont sur celles-ci qu'ont porté nos déterminations.

Les résultats de ces expériences, exprimés en g ou mEq pour 100 g de feuilles fraîches, sont rassemblés dans le Tableau n° 2.

TABLEAU N° 2. — Résultats des analyses en divers constituants des feuilles de *B. daigremontianum* Berger, obtenus sur les extraits provenant de feuilles séchées à la chaleur (lot N° 1), stabilisées par l'éthanol (lot N° 2) et sur le suc d'expression (lot N° 3), (en g ou en mEq pour 100 g de feuilles fraîches.

Constituants	*Lot N° 1 (sec)*	*Lot N° 2 (EtOH)*	*Lot N° 3 (suc)*
Matières sèches	4,310 g	3,550 g	4,700 g
Sodium	0,011 g	0,007 g	0,014 g
Potassium	0,100 g	0,054 g	0,144 g
Calcium	0,150 g	0,143 g	0,450 g
Substances réductrices (en glucose)	0,036 g	0,016 g	0,048 g
Acidité totale	21,4 mEq	24,0 mEq	39,0 mEq

De l'examen des résultats consignés dans le tableau n° 2 il ressort que l'on enregistre des pertes importantes en substances au cours du séchage ou au cours de la stabilisation par l'éthanol. Ces pertes concernent surtout les ions minéraux et les acides organiques. Pour ces derniers on peut chiffrer le déficit à 45 p. 100 au cours de la dessication à l'étuve et à 38 p. 100 lors de la stabilisation par l'éthanol. Ces pertes sont imputables à la plasmolyse des cellules sous l'action de la chaleur ou de l'alcool fort, consécutive à la très grande teneur en eau des feuilles de Crassulacées. La teneur en eau des feuilles fraîches de *B. daigremontianum* Berger, étudiées était de 91 p. 100.

L'analyse des acides organiques des trois extraits a été effectuée selon la méthode générale décrite précédemment. Les résultats sont rassemblés sous forme de graphiques dans la Figure n° 7.

L'examen des graphiques contenus dans la figure n° 7 montre que nous avons mis en évidence, dans le suc d'expression 5 fractions acides : A, B, C, D, E et F. L'analyse chromatographique des solutions provenant de la drogue séchée ou stabilisée par l'éthanol ne nous montre que quatre fractions : B, C, D, E et F.

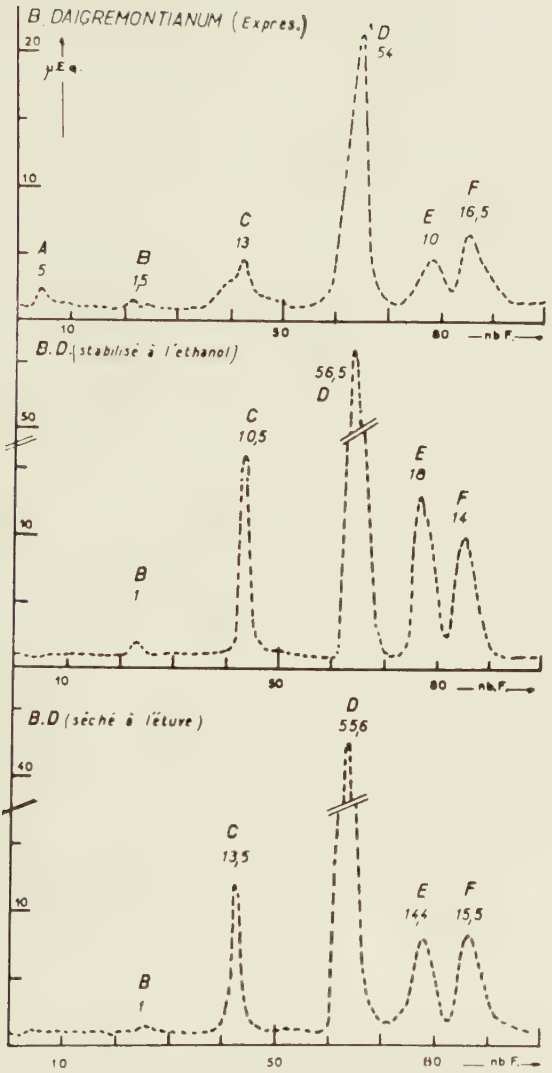


FIG. N° 7. — Chromatographies des acides organiques de *B. daigremontianum* Berger, présents dans le suc d'expression (en haut), dans la drogue stabilisée par l'éthanol (au centre) et dans les feuilles séchées par la chaleur (en bas). En ordonnées l'acidite de l'effluent (en µEq) ; en abscisses n° du tube collecté.

La contribution de chaque fraction (exprimée en p. 100 de l'acidité totale) est donnée dans le tableau n° 3.

TABLEAU N° 3. — Contribution (en % de l'acidité totale) des différentes fractions présentes dans la drogue séchée par la chaleur (lot N° 1), stabilisée par l'éthanol (lot N° 2) et dans le suc cellulaire (lot N° 3).

Fractions N°	*Lot N° 1 (sec)*	*Lot N° 2 (EtOH)*	*Lot N° 3 (suc)*
A		—	—
B	1,0	1,0	1,5
C	13,5	10,5	13,0
D	55,5	56,5	54,0
E	14,4	18,0	10,0
F	15,0	14,0	16,5

Nous avons soumis à la chromatographie sur papier les différentes fractions afin d'identifier les acides organiques qu'elles renferment. Nos résultats sont rassemblés dans le tableau n° 4.

TABLEAU N° 4. — Identification par chromatographie sur papier des acides organiques de *M. daigremontianum* Berger (R-M dans le solvant : n-butanol : ac. formique : eau).

Fraction	*Sous-fraction*	*RM*	Acide
A	A	1,5	pyruvique
B	B-1	1,28	cétoglutarique
	B-2	1,45	succinique
C	C-1	1,70	?
	C-2	0,90	?
	C-3	1,15	glycolique
	C-4	1,54	aconitique
D	D	1,0	malique
E	E	0,84	citrique
F	F	0,84	iso-citrique

Les résultats contenus dans le tableau n° 4 sont en parfait accord avec ceux décrits par JOLCHINE (47), sauf en ce qui concerne la fraction C où cet auteur met en évidence par chromatographie sur papier 6 constituants, alors que nous ne trouvons dans nos essais que 4 sous-fractions, dont deux très importantes que nous avons pu identifier à l'acide glycolique et à l'acide succinique.

Connaissant la quantité totale de l'acidité contenue dans chaque préparation (lot n° 1, lot n° 2 et lot n° 3) et en fonction des données rassemblées dans les tableaux n° 3 et n° 4, il nous a été possi-

ble de calculer la teneur des feuilles de *B. daigremontianum* Berger, en acide organiques identifiés.

Nos résultats, exprimés en g d'acide organique pour 100 g de feuilles fraîches, sont rassemblés dans le Tableau n° 5.

TABLEAU N° 5. — Teneurs en acides organiques des feuilles de *Briophyllum daigremontianum* Berger, calculées à partir des résultats obtenus selon les différentes modalités de traitement du végétal. (en g p. 100 g de feuilles fraîches) - (lot N° 1 : dessiccation par la chaleur ; lot n° 2 : stabilisation par l'éthanol ; lot N° 3 : suc d'expression.

Acide	*Lot N° 1 (sec)*	*Lot N° 2 (EtOH)*	*Lot N° 3 (suc)*
Cétoglutarique + succinique	0,014	0,016	0,040
Glycolique + aconitique	0,194	0,169	0,340
Malique	0,904	0,911	1,411
Citrique	0,198	0,275	0,250
Iso-citrique	0,210	0,220	0,412

L'examen de l'ensemble des résultats que nous venons de mentionner montre tout d'abord que nos déterminations sont en bon accord avec celles effectuées par JOLCHINE (47). Nous pouvons donc conclure en la validité des méthodes que nous avons mises en œuvre. Nos résultats montrent également que l'extraction des acides organiques à partir du suc d'expression de feuilles fraîches présente des avantages certains sur les autres procédés dont l'étape préliminaire consiste soit en la dessication par la chaleur, soit la stabilisation par l'éthanol. Si ces deux procédés ne semblent pas modifier d'une manière notable les rapports entre les différents acides ils influent d'une manière significative sur le rendement total de l'extraction.

CHAPITRE III

LES ACIDES ORGANIQUES DE BRYOPHYLLUM CRENATUM BAKER ET DE BRYOPHYLLUM CALICINUM SALISB

Les Crassulacées, et en particulier les genres *Bryophyllum* et *Kalanchoe*, d'ailleurs souvent confondus, de la sous-famille des *Kalanchoïdées*, sont réputées pour leur teneur élevée en acides organiques et en particulier en acide iso-citrique (35). PUCHER (72), en 1942, trouva, par distillation des esters méthyliques, que chez *B. Calycinum* Salisb. l'acide iso-citrique représente 52,2 p. 100 des acides totaux, les acides malique et citrique respectivement 36 et 7,8 p. 100. Ces recherches furent poursuivies par VICKERY (96), BULEN et coll. (16) ainsi que par STUTZ et BURRIS (89). Cette très grande richesse en acide iso-citrique a fait de diverses Crassulacées : *B. Calycinum* Salisb., *B. fedtschenkoi* Hamet et Perrier et *B. Crenatum* Baker, le matériel de choix pour l'extraction de l'acide iso-critique naturel.

Ces végétaux peuvent être assez facilement cultivés en serre (95), car ils possèdent une multiplication végétative par des gemmes se formant sur les feuilles (voir Figure n° 8). Cependant ayant pu nous procurer des quantités assez notables de feuilles, séchées sur place, de deux de ces végétaux africains, nous nous sommes proposée d'étudier leur composition en acides organiques. C'est ainsi que nous avons disposé de 3 g de feuilles sèches de *B. calycinum* Salisb. et de 1 kg de feuilles sèches de *B. crenatum* Baker, provenant de Bouaké (Côte d'Ivoire), d'Ouagadougou (Haute-Volta) et de Bamako (Mali).

Nous avons préparé des extraits aqueux par macération desquels ont été obtenus des extraits secs par atomisation (voir Chapitre n° 1). Les rendements de ces opérations sont les suivants :

— 1 kg de feuilles sèches de *B. calycinum* Salisb. a fourni 235 g de matériel sec

— 1 kg de feuilles sèches de *B. crenatum* Baker a fourni 210 g de matériel sec.

Ces extraits se présentent sous forme de poudres, légèrement jaunâtres, de goût acide, non hygroscopiques. L'analyse de ces pou-

FIG. N° 8. — Multiplication végétative par les gemmes des feuilles de *B. crenatum* Baker obtenue au laboratoire à partir d'un pied provenant de Bouaké (Côte d'Ivoire).

dres, en divers de leurs constituants, nous a conduit aux résultats rassemblés dans le tableau n° 6.

TABLEAU N° 6. – Teneurs en divers constituants des poudres résultat de l'extraction aqueuse des feuilles sèches de *B. calycinum* Salisb. et de *B. crenatum* Baker (en mg ou en mEq par g).

Constituant	*B. calycinum*	*B. crenatum*
Cendres	294,0 mg	317,0 mg
Sodium	0,45 mg	0,51 mg
Potassium	32,50 mg	45,0 mg
Calcium	102,00 mg	70,5 mg
Substances réductrices (en glucose)	133,00 mg	121,0 mg
Chlore	11,00 mg	7,1 mg
Acides totaux	6,95 mEq	7,1 mEq

Nous avons étudié les acides organiques présents dans les poudres obtenues à partir de *B. crenatum* Baker et de *B. calycinum* Salisb. selon la méthode générale.

Nos résultats sont rassemblés dans la Figure n° 9.

Les graphiques A-1 et B-1 de la figure n° 9 illustrent les chromatogrammes des acides organiques présents dans les extraits secs de *B. crenatum* Baker et de *B. calycinum* Salisb. Afin de pouvoir mieux identifier les acides organiques contenus en faibles quantités nous avons opéré des chromatographies semi-préparatives portant chaque fois sur 100 mg des acides totaux de chaque extrait. Nous avons développé les chromatogrammes au moyen des seuls trois premiers solvants de la technique générale. Les liqueurs butano-chloroformiques ont été rassemblées et les acides organiques extraits au moyen d'une solution 0,1 N de soude. Les solutions alcalines ont été admises sur une colonne de 25 g de Dowex-50, afin de fixer les ions métalliques. L'éluat acide est concentré sous vide jusqu'à faible volume, puis a seccité à l'étuve à 37°C. C'est sur ces fractions préparées à partir des acides totaux de *B. crenatum* Baker et de *B. calycinum* Salisb. que nous avons réalisé les chromatographies dont les schémas respectivement A-2 et B-2 sont illustrés dans la Figure n° 9.

L'examen des graphiques A-1 et B-1 de la figure n° 9 montre la présence de 6 fractions acides (A, B, C, D, E et H) dans l'extrait de *B. crenatum* Baker et de 7 fractions (A, B, B', C, D, E et H) dans l'extrait de *B. calycinum* Salisb. La chromatographie sur papier nous a permis d'identifier les fractions D, E et H respectivement aux acides malique, citrique et iso-citrique.

Les chromatogrammes correspondant à la séparation des acides organiques de solubilités relativement élevées dans les pha-

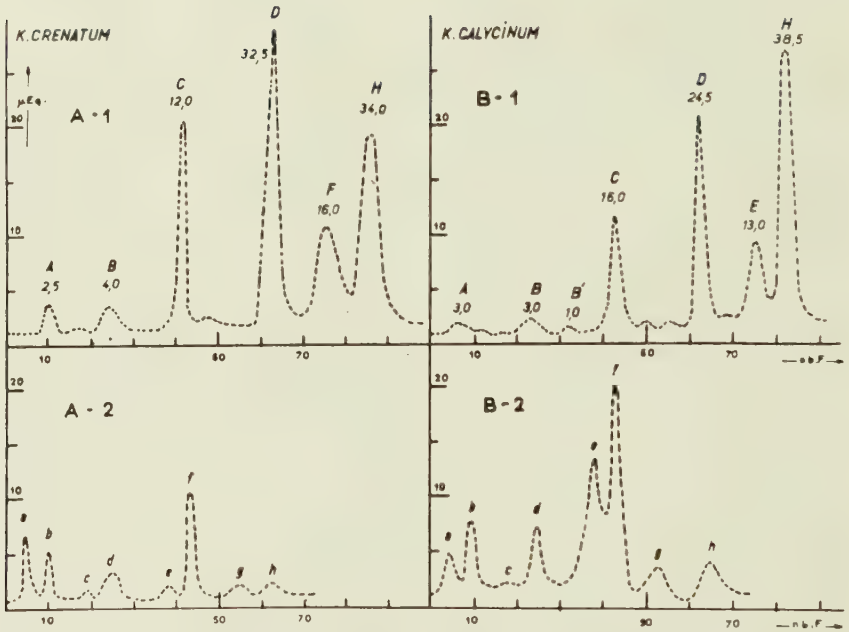


FIG. N° 9. — Chromatographies des acides organiques de *B. crenatum* Baker et de *B. calycinum* Salisb (A-1 : 21 mg des acides totaux de *B. crenatum* ; B-1 : 19 mg des acides totaux de *B. calycinum* ; A-2 : 15 mg des acides organiques de *B. crenatum* élués par les solvants 1, 2 et 3 de la technique générale ; B-2 : 12 mg des acides organique de *B. calycinum* élués par les solvants 1, 2 et 3 de la technique générale)

En ordonnées = acidité de l'effluent (en µEq)

En abscisses = n° du tube collecté

ses riches en chloroforme (graphiques A-2 et B-2 de la figure n° 9) indiquent la présence de 7 fractions acides (a, b, c, d, e, f, g et h) aussi bien dans le *B. crenatum* Baker que dans le *B. calycinum* Salisb. Nous avons soumis à la chromatographie sur papier ces différentes fractions (sauf la fraction c qui ne se trouve présente qu'en trop faible quantité) afin d'identifier leurs constituants. Nos résultats sont rassemblés dans le tableau n° 7.

TABLEAU N° 7. – Identification par chromatographie sur papier des acides organiques des fractions a, b, d, e, f, g et h des extraits de *B. crenatum* Baker et de *B. calycinum* Salisb. (R-M dans le solvant : n-butanol : acide formique : eau).

B. crenatum			*B.calycinum*			*Acide*
Fraction	*Sous-fract.*	*R-M*	*Fraction*	*Sous-fract.*	*R-M*	
d	d	1,53	d	d	1,77	fumarique
a	a-1	0,46	a	a-1	0,41	?
	a-2	1,03		a-2	0,64	?
	a-3	1,77		a-3	0,78	?
	a-4	1,88		a-4	1,32	?
b	b	1,77	b	b	1,77	fumarique
d	d	1,53	d	d	1,53	succinique
e	e	1,45	e	e	1,45	aconique
f	f-1	0,83	f	-	-	?
	f-2	1,16		f	1,15	glycolique
g	g-1	0,97	g	g-1	0,97	?
	g-2	1,66		g-2	1,56	?
h	h	1,00	h	h	1,00	malique

De l'examen de nos résultats, il ressort que les compositions qualitatives en acides organiques des extraits végétaux des deux Bryophyllum étudiés sont très voisines. L'ensemble des deux techniques chromatographiques montre la présence de 14 composés dans les deux types de feuilles. Nous avons identifié les acides : fumarique, succinique, glycolique, aconitique, malique, citrique et iso-citrique. Les sept autres composés n'ont pu être caractérisés. Ils ne se trouvent qu'en très faibles proportions, et nous n'avons réussi à les mettre en évidence qu'après une purification par une étape de chromatographie sur colonne semi-préparative. Il n'est pas exclu par ailleurs, que certains de ces composés soient absents dans le végétal frais et qu'ils proviennent d'altérations ou de modifications subies par les drogues au cours des manipulations.

Connaissant l'acidité totale présente dans chaque extrait il nous a été possible, en fonction des proportions relatives entre les principaux acides déterminés par chromatographie sur Celite, de calculer la teneur de nos extraits en acide succinique, glycolique + aconitique, malique, citrique et iso-citrique.

Ces résultats sont rassemblés dans le tableau n° 8.

TABLEAU N° 8. — Teneurs en acides organiques des extraits atomisés de *B. crenatum* Baker et de *B. calycinum* Salisb. (en mg pour 1 g d'extrait atomisé).

Acide	*B. crenatum*	*B. calycinum*
Succinique	17	12
Glycolique + aconitique	53	69
Malique	155	115
Citrique	73	58
Iso-citrique	154	173

L'examen de ces résultats montre que nos déterminations sont en bon accord avec celles effectuées par d'autres auteurs. L'acide iso-citrique représente ici l'acide organique le plus important puisque sa teneur représente 34,0 p. 100 de l'acidité totale chez *B. crenatum* Baker et 38,5 p. 100 de l'acidité totale de *B. calycinum* Salisb., valeurs particulièrement notables si on les compare à celle trouvée pour *B. daigremontianum* Berger (16 p. 100 de l'acidité totale) chez lequel l'acide malique prédomine (55 p. 100 de l'acidité totale).

Ceci justifie l'intérêt de ces deux végétaux comme source d'acide iso-citrique naturel. Les extraits atomisés obtenus à partir des drogues sèches, contenant en poids de 15 à 18 p. 100 de cet acide, constituent des matériels de choix pour l'isolement en quantité importante de cette substance.

CHAPITRE IV

LES ACIDES ORGANIQUES DE LA CAROTTE

(Daucus Carota L.)

La carotte (*Daucus carota* L.), herbe bis-annuelle très commune dans nos champs et nos prés, est certainement le prototype de la carotte cultivée et améliorée par sélections poursuivies à travers les âges. Le *Daucus* des Latins, le *Daucos* des Grecs représentent la carotte sauvage utilisée comme plante médicinale. Les Grecs avaient aussi le nom de *Karoton*, en latin *Carota* d'où vient le mot de carotte. PICTET, savant linguiste, en trouve l'étymologie dans le Sanscrit. Cet indice linguistique ne prouve cependant pas que la culture de la carotte remonte aux Aryas primitifs, mais peut lui assigner une antiquité de plus de 2.000 ans.

Nous avons disposé d'un lot de carottes cultivées dont nous avons séparé la racine (665 g) et les feuilles (228 g). Après expression, nous avons recueilli à partir des racines 430 ml de suc, et à partir des feuilles 180 ml. La teneur en eau des racines a été trouvée égale à 92 p. 100 et celle des feuilles à 95 p. 100. Ceci nous a conduit à admettre des rendements d'expression respectivement égaux à 70 p. 100 pour les racines et à 62,5 p. 100 pour les feuilles.

Les résultats des analyses des sucs d'expression sont rassemblés dans le tableau n° 9.

TABLEAU N° 9. — Teneurs en divers constituants des sucs d'expression des racines et des feuilles de carottes (en g. ou en mEq. pour 100 ml).

Constituant	*Racine*	*Feuille*
Résidu sec	6,35 g	5,07 g
Cendres	0,52 g	1,41 g
Sodium	0,046 g	0,900 g
Potassium	0,174 g	0,335 g
Calcium	0,021 g	0,221 g
Substances réductrices (en glucose)	2,34 g	2,50 g
Acidité totale	9,00 mEq	28,00 mEq

De l'examen des résultats contenus dans le tableau ci-dessus il ressort essentiellement la richesse en acides organiques des feuilles par rapport à la racine.

Les graphiques correspondant à l'analyse chromatographique des acides organiques, par la technique générale, des sucs d'expression des racines et des feuilles de carottes sont rassemblés dans la figure n° 10.

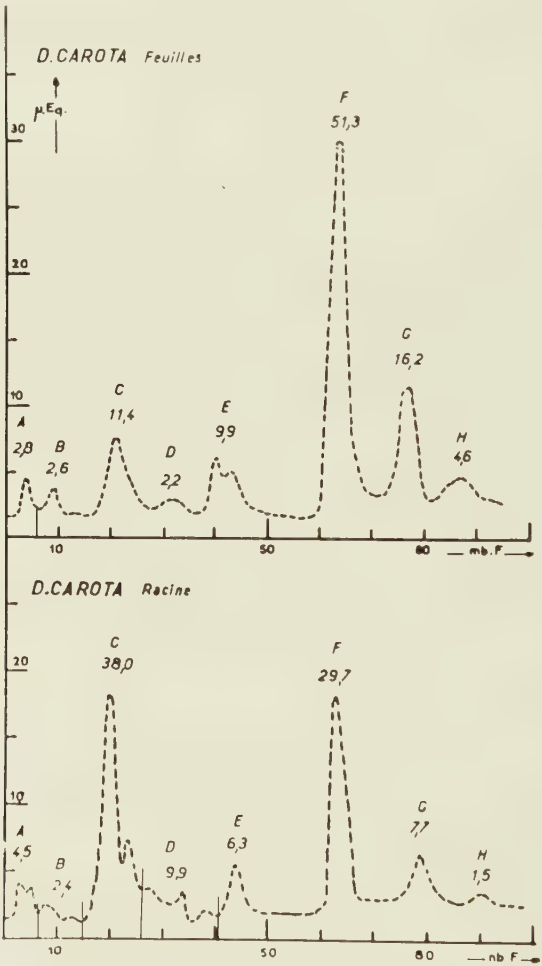


FIG. N° 10. — Chromatographies des acides organiques des feuilles et des racines de carotte *(Daucus carola* L.) (en ordonnées = acidité en µEq ; en abscisses : n° du tube collecté).

L'examen des graphiques contenus dans la figure n° 10 montre que nous avons mis en évidence 8 fractions acides (A, B, C, D,

E, F et G) dans chaque échantillon. La chromatographie sur papier nous a permis d'identifier certains acides organiques présents dans les fractions mises ainsi en évidence. Nos résultats sont rassemblés dans les tableaux n° 10 et 11.

TABLEAU N° 10. – Identification par chromatographie sur papier des acides organiques du suc cellulaire des feuilles de *Daucus carota* L. (R-M dans le système n-butanol : acide formique : eau).

Fraction	*P.* 100 *de l'acidité totale*	*Sous-fraction*	*R-M*	*Acide*
A	2,8	A-1	0,98	?
		A-2	1,51	?
		A-3	1,78	?
B	2,6	B	1,77	fumarique
C	11,4	C	1,53	succinique
D	2,2	—	—	?
E	9,9	E-1	0,79	?
		E-2	1,15	glycolique
		E-3	1,45	aconitique
F	51,3	F	1,00	malique
G	16,2	G	0,84	citrique
H	4,6	H	0,84	iso-citrique

TABLEAU N° 11. — Identification par chromatographie sur papier des acides organiques du suc cellulaire des feuilles de *Daucus carota* L. (R-M dans le système n-butanol : acide formique : eau).

Fraction	*P.* 100 *de l'acidité totale*	*Sous-fraction*	*R-M*	*Acide*
A	4,5	A-1	0,98	?
		A-2	1,51	?
		A-3	1,74	?
B	2,4	B	1,77	fumarique
C	38,0	C	1,53	succinique
D	9,9	—		?
E	6,3	E-1	0,79	?
		E-2	0,97	?
		E-3	1,15	glycolique
		E-4	1,45	aconitique
F	29,7	F	1,00	malique
G	7,7	G	0,84	citrique
H	4,6	H	0,84	iso-citrique

La chromatographie sur papier des fractions séparées par chromatoraphie sur colonne nous a conduit à admettre la présence d'au moins 12 acides organiques dans les feuilles et 13 acides dans les racines de carotte. Parmi ceux-ci 7 acides ont été identifiés, respectivement les acides : fumarique, succinique, glycolique, aconitique, malique, citrique et iso-citrique. Les fractions A sont composées des mêmes acides (A-1, A-2 et A-3) dans la feuille et dans la racine. Les fractions E comprenant essentiellement l'acide glycolique et l'acide aconitique, contiennent également un acide (E-1) commun aux deux parties du végétal, par contre l'acide E-2 n'a été mis en évidence que dans les racines. Nous n'avons pu, en raison de sa faible proportion, étudier la fraction D par chromatographie sur papier.

Connaissant l'acidité totale des sucs cellulaires, les rendements de l'étape d'expression et les teneurs relatives des acides identifiés, nous avons pu calculer les quantités de ces acides présents dans les racines et les feuilles de *Daucus Carota* L. Nos résultats exprimés en g d'acide pour 100 g de tissu frais, sont rassemblés dans le tableau n° 12. Nous avons également placé dans ce tableau les résultats enregistrés par OVERELL (15) sur l'analyse des acides organiques du tissu de carotte, seuls résultats, à notre connaissance portant sur l'étude de ce végétal.

TABLEAU n° 12. — Teneurs en acides organiques des feuilles et des racines de carotte selon nos déterminations et des racines de carotte selon OVERELL (15) (en g d'acides organiques pour 100 g de tissu frais).

Acide	*Feuille*	*Racine*	*Racine (selon OVERELL)*
Fumarique	0,07	0,02	0,06
Succinique	0,30	0,29	0,65
Glycolique + aconitique	0,29	0,05	—
Malique	1,54	0,26	3,20
Citrique	0,47	0,06	trace
Iso-citrique	0,13	0,04	0,39
Non-identifié 1	—	—	trace
Non-identifié 2	—	—	trace
Non-identifié 3	—	—	0,18

L'examen des résultats contenus dans le tableau n° 12 amène un certain nombre de remarques. On peut constater que nos déterminations montrent la prédominance de l'acide malique dans les feuilles de carottes, alors que ce rôle est tenu par l'acide succinique dans la racine. On note également que dans la feuille la proportion d'acide citrique est plus élevée que celle de l'acide iso-

citrique, il en est de même dans les racines bien qu'ici les quantités de ces deux composés soient relativement faibles.

En ce sens les résultats d'OVERELL (15) sont en contradiction avec nos déterminations, tant en ce qui concerne les teneurs que les proportions relatives des acides malique, citrique, iso-citrique et succinique. Bien qu'il soit difficile de donner une interprétation à ces différences, on peut supposer que les techniques d'extraction, de séparation et de dosage (extraction aqueuse du tissu de carotte séchée 48 h à 80°C, séparation par chromatographie par échange d'ions, dosage par évaluation des surfaces des spots séparés par chromatographie sur papier), très différentes des méthodes que nous avons mises en œuvre, puissent expliquer ces résultats. Ceci nous permet de souligner tout particulièrement les difficultés rencontrées lors de l'étude de la répartition des acides organiques chez les végétaux.

CHAPITRE V

LES ACIDES ORGANIQUES DE LA VIGNE VIERGE

Ampelopsis hederacea Michx

La vigne vierge (*Ampelopsis hederacea* Michx.), en anglais Virginia creeper, est répandue en Europe, en Asie (de l'Himalaya au Japon), en Malaisie, en Amérique du Nord Atlantique et au Mexique. L'acide glycolique a été extrait des feuilles vertes et des grappes non mures de ce végétal. C'est la raison qui nous a fait étudier la feuille de cette plante car nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'autre renseignement sur sa composition en acides organiques.

Nous avons disposé d'un lot de 715 g de feuilles dépétiolées, récoltées à Cadenet (Vaucluse) en mai 1968. L'expression de ces feuilles nous a fourni 340 ml de suc. La teneur en eau du végétal est de 81,3 p. 100 ce qui conduit à admettre un rendement de l'opération d'extraction de 61 p. 100.

Les résultats de nos analyses portant sur différents constituants du suc d'expression sont rassemblés dans le tableau n° 13.

TABLEAU N° 13. — Teneurs en divers constituants du suc d'expression des feuilles de Vigne Vierge (*A. hederacea*, Michx.) (en g ou en mEq pour 100 ml de suc d'expression).

Constituant	*Teneur*	
Résidu sec	4,91	g
Cendres	0,83	g
Sodium	0,003	g
Potassium	0,333	g
Calcium	0,134	g
Substances réductrices (en glucose	1,45	g
Acidité totale	26,0	mEq

L'analyse chromatographique sur Célite des acides organiques présents dans le suc d'expression est présenté sous forme de graphique dans la figure n° 11.

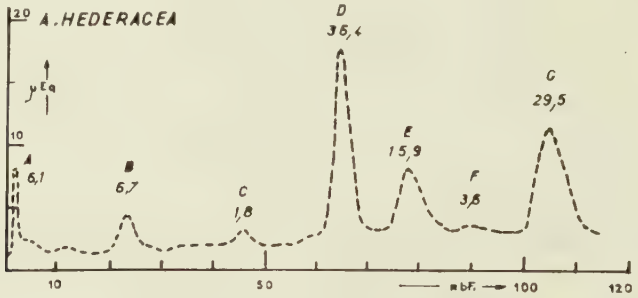


FIG. N° 11. — Chromatographie des acides organiques présents dans le suc d'expression des feuilles de Vigne Vierge (*A. hederacea* Michx.) (en ordonnées : acidité en µEq ; en abscisses : n° du tube collecté).

L'examen du graphique contenu dans la figure n° 13 montre que nous avons pu mettre en évidence 6 fractions acides (A, B, C, D, E, F et G). La composition des fractions B, C, D, E, F et G a été précisée par la chromatographie sur papier. Connaissant l'acidité totale de l'extrait et le rendement de l'étape d'extraction, ainsi que la proportion relative des constituants identifiés, nous avons calculé la quantité de ces acides présents dans les feuilles de Vigne Vierge. Le dosage de l'acide oxalique a été effectué directement sur les feuilles selon la technique de CARLES (22).

L'ensemble de nos résultats est rassemblé dans le tableau n° 14.

TABLEAU N° 14. — Identification des fractions acides séparées par chromatographie sur colonne — contribution à l'acidité totale du végétal — teneurs en acides organiques des feuilles de Vigne Vierge (*A. hederacea*, Minchx.) (en g p. 100 g de feuilles fraîches).

Fraction	*P. 100 de l'acidité totale du suc*	*Acide*	*Teneur (en g p. 100 g)*
A	6,1	non-identifié	—
B	6,7	succinique	0,17
C	1,8	glycolique	0,05
D	36,4	malique	1,14
E	15,9	citrique	0,45
F	3,6	iso-citrique	0,10
G	29,5	tartrique	0,63
—	—	oxalique	0,61

De l'examen de ces résultats il ressort que nous avons identifié et dosé les principaux acides organiques présents dans les feuilles de Vigne Vierge (*A. hederacea* Michx.) à savoir : les acides succinique, glycolique, malique, citrique, iso-citrique, tartrique et oxalique. On notera que les poly-acides- poly-alcools, malique, citrique et tartrique représentent (en poids) près de 60 p. 100 des acides organiques. La teneur en acide glycolique n'apparaît pas en tant que constituant majeur comme le laissait supposer la littérature.

CHAPITRE VI

LES ACIDES ORGANIQUES DE L'OSEILLE

Rumex acetosa L.

L'oseille croît à l'état sauvage dans les prairies et les champs de toute la France, dans tous les pays d'Europe, ainsi qu'en Afrique, en Asie, au Groënland, en Amérique boréale et au Chili. C'est une plante vivace, à racine épaisse, ligneuse, à feuilles de forme et de dimension variables. Les Anciens cultivaient l'oseille comme plante potagère. Le *Rumex* de PLINE et de VIRGILE devait comprendre les espèces à feuilles acides du genre Rumex et par conséquent, notre oseille. Au XII[me] siècle cependant les glossaires latins-romans commencent à citer le nom : *acidula, acetosa, acida,* en langue romane *surele*. Surelle est encore le nom vulgaire de l'oseille qui s'est conservé à notre époque dans l'anglais *sorrel*. Du XIV[me] siècle jusqu'au XVII[me] siècle son emploi est général en cuisine.

L'oseille étant une plante dioïque on choisit de préférence des pieds mâles pour la formation des bordures de jardin. Ces oseilles mâles, appelées aussi oseille vierge, sont multipliées par division des touffes.

La racine jouit de propriétés purgatives dues à la présence de principes oxyméthylanthraquinoniques. Le suc d'oseille est antiscorbutique. On a signalé des cas d'empoisonnements mortels consécutifs à l'absorption d'une grande quantité de feuilles. Les symptômes sont ceux de l'intoxication par l'acide oxalique et les oxalates.

Les feuilles fraîches et les racines étaient inscrites à la Pharmacopée Française (Codex 1866-1895) et à la Pharmacopée Espagnole (1797-1884).

Nous avons disposé d'un lot de 400 g de feuilles fraîches d'oseille vierge, récoltées en août 1969 à VILLARD-LATE (Hautes-Alpes). L'expression de ces feuilles nous a fourni 300 ml de suc. La teneur du végétal en eau est de 90,7 p. 100, ce qui nous a conduit à admettre un rendement de l'opération d'expression de 83 p. 100.

Les résultats de nos analyses portant sur les feuilles fraîches et sur le suc d'expression sont rassemblés dans le tableau n° 15.

TABLEAU N° 15. — Teneurs en divers constituants des feuilles fraîches d'Oseille (*R. acetosa*, L.) et de leur suc d'expression.

Constituant	*Feuilles fraîches*	*Suc d'expression*
Résidu sec	9,30 g	3,83 g
Cendres	1,28 g	0,87 g
Sodium	0,004 g	0,003 g
Potassium	0,280 g	0,230 g
Calcium	0,110 g	0,000 g
Chlorure	0,043 g	0,036 g
Acide oxalique	0,986 g	0,832 g
Acidité totale	—	36,0 mEq

L'examen de nos résultats montre que la présence d'une quantité importante d'acide oxalique insolubilise la totalité du calcium, ce qui explique l'absence de cet ion dans le suc d'expression.

L'analyse des acides organiques par chromatographie a été réalisée sur deux échantillons : le premier est le suc d'expression, le second est constitué de ce dernier après précipitation de l'acide oxalique sous forme de sel de calcium. Pour cela nous avons ajouté à chaud, à 50 ml de suc d'expression, un poids de chlorure de calcium double de la quantité théorique nécessaire à la précipitation de la totalité de l'acide oxalique présent dans la prise d'essai. Après avoir abandonné la préparation 12 heures, nous avons éliminé le précipité d'oxalate de calcium par centrifugation. Les acides organiques ont été libérés de la liqueur selon la technique générale.

Nos résultats sont présentés sous forme de graphiques dans la Figure n° 12.

L'examen des graphiques contenus dans la figure n° 12 montre que nous avons mis en évidence par chromatographie sur colonne 7 fractions acides dans le suc cellulaire de l'oseille : A, B, C, D, E, F et G. L'élimination de l'acide oxalique de la préparation permet d'une part de caractériser ce dernier comme principal constituant de la fraction C. Celle-ci contient, en outre, un composé acide C' en très faible proportion.

La chromatographie sur papier nous a permis de caractériser certains acides des fractions B, C, D, E, F et G. La fraction A qui ne représente que 0,9 p. 100 de l'acidité totale, n'a pas été étudiée. Connaissant l'acidité totale du suc d'expression, le rendement de l'étape d'extraction et la proportion relative des acides identifiés, nous avons pu déterminer la composition en acides organiques des feuilles de *R. acetosa* L. que nous présentons dans le tableau n° 16.

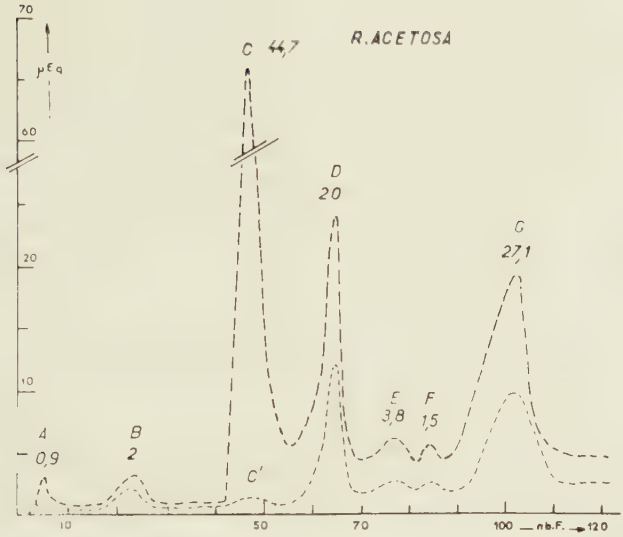


FIG. N° 12. — Chromatographie des acides organiques de l'oseille *R. acetosa* L.) (trait épais : suc d'expression ; trait fin : suc d'expression après élimination de l'acide oxalique). En ordonnées : acidité en µEq; en abscisse : n° du tube collecté.

TABLEAU N° 16. — Identification des fractions acides séparées par chromatographie sur colonne — contribution à l'acidité totale du végétal — teneurs en acides organiques des feuilles d'oseille (*R. acetosa* L.) (en g p. 100 g de feuilles fraîches).

Fraction	*P. 100 de l'acidité totale du suc*	*Acide*	*Teneur (en g p. 100 g)*
A	0,9	non-identifié	——
B	2,0	succinique	0,05
C	44,7	oxalique	0,99
C'	traces	non-identifié	traces
D	20,0	malique	0,58
E	3,8	citrique	0,11
F	1,5	iso-citrique	0,04
G	27,1	tartrique	0,88

De l'examen des résultats rassemblés dans le tableau n° 16 il ressort que nous avons identifié les principaux acides organiques présents dans l'oseille, à savoir : l'acide succinique, l'acide oxalique, l'acide citrique, l'acide iso-citrique et l'acide tartrique.

Les trois principaux constituants sont, dans l'ordre décroissant, l'acide oxalique, l'acide tartrique et l'acide malique, qui représentent (en poids) près de 93 p. 100 des acides des feuilles d'oseille.

CHAPITRE VII

INTERPRETATION DES RESULTATS

De l'ensemble des analyses effectuées nous retiendrons essentiellement les résultats obtenus lors de l'étude des feuilles de *B. daigremontianum* Berger, de la carotte, de la vigne vierge et de l'oseille. En effet, ce travail a pu être réalisé, dans les mêmes conditions expérimentales, ce qui justifie la comparaison des résultats portant sur ces végétaux.

Nous avons rassemblé dans le tableau n° 17 l'ensemble de nos déterminations portant sur le dosage des principaux acides organiques. Ces résultats sont exprimés d'une part en quantité d'acide organique (en g) pour 100 g de feuilles fraîches et d'autre part en pourcentage d'un acide organique par rapport au poids total des acides dosés.

De l'examen des résultats rassemblés dans ce tableau il ressort que l'on peut classer ces végétaux en deux groupes : le premier comprend le *B. daigremontianum* et la carotte, le second la vigne vierge et l'oseille.

En effet, chez *B. daigremontianum* et dans la carotte l'acide malique est l'acide organique le plus abondant (57 et 55 p. 100 des acides) alors que l'on n'y rencontre ni acide tartrique, ni acide oxalique. Par contre, la vigne vierge et l'oseille sont très riches en ces deux acides, qui ensemble, représentent 49,4 et 70,4 p. 100 des acides totaux, l'acide malique étant en proportion moindre (36,3 et 21,9 p. 100.

On note également que les acides tartrique et oxalique sont accompagnés de très faibles quantités d'acide glycolique et aconitique (1,6 p. 100 chez la vigne vierge, traces dans l'oseille), alors que leur absence correspond à des teneurs notables de ces acides respectivement égales à 13,8 p. 100 chez *B. daigremontianum* et 10,4 p. 100 chez la carotte. Ceci peut s'expliquer, à partir de nos connaissances sur la biosynthèse des acides tartrique et oxalique dont l'origine se trouve être l'acide glycolique.

Les acides citrique et iso-citrique se rencontrent chez les quatre plantes étudiées. La quantité d'acide citrique est quatre fois supérieure à celle de l'acide iso-citrique, sauf chez *B. daigremon-*

TABLEAU N° 17. — Comparaison des teneurs en divers acides organiques des feuilles de *B. daigremontianum*, de carotte, de Vigne Vierge et d'Oseille (en g p. 100 g de feuilles fraîches et en p. 100 en poids d'acide par rapport aux acides totaux dosés.

	B. daigremont.		Carotte		Vigne Vierge		Oseille	
Acidité totale (mEq/100 g)	39,0		44,0		42,6		43,3	
Acides	g/100	% (poids)	g/100	% (poids)	g/100	% (poids)	g/100	% (poids)
Fumarique	—	—	0,07	2,5	—	—	—	—
α-cétoglutarique + succinique	0,04	1,6	0,30	10,7	0,17	5,3	0,05	1,8
Glycolique + aconitique	0,34	13,8	0,29	10,4	0,05	1,6	traces	traces
Malique	1,41	57,5	1,54	55,0	1,14	36,3	0,58	21,9
Citrique	0,25	10,2	0,47	16,8	0,45	14,3	0,11	4,1
Iso-citrique	0,41	16,9	0,13	4,6	0,10	3,1	0,04	1,5
Tartrique	—	—	—	—	0,63	20,0	0,88	33,3
Oxalique	—	—	—	—	0,61	19,4	0,99	37,4

tianum dans lequel l'acide iso-citrique est deux fois plus abondant que son isomère.

La carotte se signale par la présence en quantité relativement élevées d'acide succinique (10,7 p. 100) et d'acide fumarique (2,5 p. 100).

En conclusion, il apparaît que les rapports entre les principaux acides organiques sont assez caractéristiques pour les végétaux étudiés, ce qui doit traduire les différences qualitatives et quantitatives des systèmes enzymatiques qu'ils renferment.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

Nous avons exposé à partir de données bibliographiques les principales voies du métabolisme des acides organiques. Il ressort essentiellement des nombreuses recherches poursuivies dans ce domaine que les acides organiques participent d'une manière complexe à l'économie de la plante.

L'assimilation chlorophyllienne aboutit à la formation d'acides organiques qui sont les précurseurs d'autres constituants fondamentaux de la cellule, et en particulier des aminoacides. Mais la présence des dérivés carboxyliques résulte également de la dégradation des molécules qu'ils ont permis d'élaborer. En outre, ils participent aux cycles de dégradation qui conduisent aux liaisons riches en énergie utilisable par le végétal, ceci s'accompagnant de la libération de gaz carbonique. Les acides organiques sont représentés quantitativement comme la résultante de phénomènes de synthèse et de phénomènes de dégradation, correspondant à un équilibre dynamique.

L'accumulation de certains acides constitue un caractère particulier du métabolisme des végétaux. Ce stockage peut apparaître sous l'angle d'une véritable détoxication. Cependant, en règle générale, cette conception ne peut être acceptée. Si cette accumulation s'explique, dans le fruit en particulier, par l'absence de systèmes enzymatiques de dégradation, les mécanismes mis en jeu dans le cadre général, sont beaucoup plus complexes, d'autant que se superposent des phénomènes de transferts entre les diverses parties du végétal (1).

On considère, à l'heure actuelle, un autre aspect de la présence en quantité variable des acides organiques. L'énergie primaire fournie à la plante, constituée par la lumière et la chaleur, est un facteur externe et périodique (alternance du jour et de la nuit, alternance des saisons). Il a été montré (QUEIROZ, 73) que « l'action cumulative d'un facteur périodique externe... se traduit par un glissement progressif d'un régime métabolique stable vers un autre régime de fonctionnement, quantitativement, et sous certains rapports qualitativement différents et dont la stabilisation ne sera acquise qu'après un temps plus ou moins long » (*loc. cit*).

Or, l'activité des systèmes enzymatiques est régularisée par les métabolites eux-mêmes : activation et inhibition, induction de la synthèse d'enzymes, soit directement soit indirectement. Un

constituant peut donc appartenir à plusieurs ensembles réactionnels et dans chaque cas, posséder une activité différente. C'est ainsi que l'on a décrit deux pools d'acide malique : un pool cytoplasmique (acide provenant de la fixation du gaz carbonique, acide exogène) et un pool mitochondrial : ce dernier étant actif, le premier de réserve. Il semble possible d'envisager que le pool d'acide malique "inactif" puisse exercer un rôle distinct de celui marqué à travers le cycle de KREBS et qui pourrait être de régulariser les réactions enzymatiques. Il reste donc posés les problèmes de l'harmonisation entre les diverses voies métaboliques et de la mise en œuvre de la chaîne des signaux qui agissent sur la synthèse d'enzymes, surtout au niveau génétique.

Nous avons rassemblé, au cours d'une brève revue, les principes des techniques employées pour extraire, identifier et doser les acides organiques des végétaux. L'eau additionnée de divers acides minéraux (sulfurique, chlorhydrique) est le solvant d'extraction le plus largement utilisé. La purification des extraits aqueux est obtenue actuellement par l'emploi successif de résines cationiques et anioniques. La chromatographie sur colonne de gel de silice ou de célite, suivie de la chromatographie sur papier permet le dosage et l'identification des principaux acides organiques avec une bonne sécurité. Au cours de ces dernières années, les possibilités offertes par la chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques et la chromatographie sur couche mince des acides eux-mêmes ou de leurs dérivés ont été explorées. La rapidité des réponses données par ces méthodes ainsi que les faibles quantités des échantillons nécessaires en font des procédés analytiques qui, sans nul doute, seront mis en œuvre systématiquement dans un proche avenir.

Quoi qu'il en soit, il n'en demeure pas moins qu'actuellement l'analyse des végétaux en acides organiques est délicate et nécessite, en raison des nombreuses étapes qui doivent être réalisées, une durée d'opération excédant une semaine par échantillon. Il faut également noter que l'identification et le dosage des acides présentant des structures fragiles, très réactifs ou en faibles proportions dans le matériel biologique, nécessitent la mise en œuvre de méthodes particulières.

Nous nous sommes attachés au cours de notre travail expérimental à préciser la composition en acides organiques de divers végétaux réputés riches en certains acides organiques afin de pouvoir comparer les proportions relatives des principaux dérivés carboxyliques et d'essayer de voir si quantitativement et qualitativement il n'était pas possible d'établir une relation entre les divers résultats enregistrés.

Nous avons décrit dans le PREMIER CHAPITRE de notre thèse l'ensemble de la technique que nous avons mise en œuvre. Celle-ci comprend trois étapes principales : une étape d'extraction et de purification, une étape de séparation par chromatographie

sur colonne de célite et une étape d'identification par chromatographie sur papier.

Afin de contrôler l'efficacité du mode opératoire choisi nous avons testé le comportement de 30 acides organiques dont 9 ont été synthétisés au laboratoire.

Disposant d'une technique éprouvée nous avons envisagé, tout d'abord, l'influence de deux procédés de stabilisation (dessication par la chaleur, stabilisation par l'éthanol) sur les résultats analytiques relatifs à la teneur en acides organiques des feuilles d'une plante largement étudiée : le *Bryophyllum daigremontianum* Berger. Ces déterminations ont été comparées avec celles obtenues lors de l'analyse du suc d'expression directe du matériel fraîchement récolté. A cette occasion, nous avons décrit un appareillage simple qui permet de préparer, avec un bon rendement, le suc tissulaire, et ce, sur des quantités relativement importantes de feuilles fraîches.

Nos résultats montrent que les teneurs en acides des feuilles de *B. daigremontianum* Berger, calculées à partir des analyses portant sur le suc d'expression, sont en bon accord avec celles relevées dans la littérature. Par contre, la stabilisation par l'éthanol et la dessication par la chaleur conduisent à des pertes comprises entre 30 et 40 p. 100. Néanmoins, il ne semble pas que ces procédés modifient, d'une manière notable, les proportions relatives des différents acides organiques dosés.

Ayant pu disposer de feuilles sèches de *B. calycinum* Salibs. et de *B. crenatum* Baker, nous avons mis en évidence dans chaque drogue 11 acides organiques dont 7 ont été identifiés. La comparaison de ces déterminations avec celles obtenues à partir des feuilles sèches de *B. daigremontianum* Berger, montre que les végétaux africains présentent des teneurs particulièrement élevées en acide iso-citrique (34,0 p. 100 pour *B. crenatum* et 38,5 p. 100 pour *B. calycinum* de l'acidité totale) par rapport au *B. daigremontianum* (16,5 p. 100 de l'acidité totale). Ceci justifie l'utilisation de ces végétaux comme source de cet acide. L'atomisation des extraits aqueux des feuilles séchées conduit à une poudre de parfaite conservation et de teneur importante (de 15 à 18 p. 100) en acide iso-citrique.

La dernière partie de nos recherches a été consacrée à l'identification et au dosage des acides organiques de trois végétaux indigènes : la Carotte, la Vigne Vierge et l'Oseille.

La comparaison de nos résultats portant sur les analyses des feuilles montre l'importance quantitative de l'acide malique, la teneur moyenne en acide citrique et la faible teneur en acide iso-citrique. En ce qui concerne la Vigne Vierge et l'Oseille on observe la présence de quantités notables d'acide tartrique et d'acide oxalique, alors que ces deux acides sont absents dans la Carotte et chez *B. daigremontianum*. Ceci laisse supposer des voies parallèles pour la biosynthèse de ces deux composés.

La feuille et la racine de carotte se caractérisent par leur forte teneur en acide succinique dont les rapports avec les polyterpènes (β-carotène) ont été démontrés. Cet acide ne se retrouve qu'en faibles proportions chez les Bryophyllum, la Vigne Vierge et l'Oseille.

EN RESUME nous avons décrit dans notre thèse, tout d'abord l'ensemble de la technique qui nous a permis d'identifier et de doser les principaux acides organiques présents chez certains végétaux. Cette méthode, inspirée des travaux de CARLES et ALQUIER-BOUFFARD et de JOLCHINE, a été testée sur 30 acides organiques afin de vérifier ses possibilités entre nos mains. Sa mise en œuvre nous a conduit à montrer, sur un cas précis, que l'obtention d'un suc tissulaire d'expression grâce à un appareillage simple que nous avons mis au point, présente des avantages certains comme première étape de l'extraction à partir des végétaux frais.

L'étude de trois Crassulacées : *Bryophyllum daigremontianum* Berger, *Bryophyllum crenatum* Baker et *Bryophyllum calycinum* Salisb a confirmé l'importance de l'acide iso-citrique comme constituant des feuilles de ces végétaux. La préparation d'un atomisat d'extrait aqueux des feuilles sèches représente un moyen intéressant de conservation d'un matériel riche en acides organiques. Enfin on trouvera dans ce travail nos résultats portant sur l'identification et le dosage des principaux acides organiques des feuilles et des racines de Carotte (*Daucus carota* L), des feuilles de Vigne Vierge (*Ampelopsis hederacea* Minchx.), et de l'Oseille (*Rumex acetosa* L.)

LU et APPROUVE,
LE PRESIDENT DU JURY :
Professeur J.-C. DUMAZERT

VU et APPROUVE,
LE DOYEN :
PROFESSEUR C. GREBUS

BIBLIOGRAPHIE

1. ALQUIER-BOUFFARD (A.). — *Physiol. Veget.*, 1969, *7*, 201.
2. ARREGUINE (V.) et GARCIA (E.D.). — *Ann. Chim.*, 1920, *2*, *36*.
3. AUBERT (E.) — *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 1890, *37*, 135.
4. AUBERT (E.). — *Rev. gen. Bot.*, 1890, *2*, 369.
5. BANCHER (E.) et SCHERZ (H.). — *Mikrochim. Acta*, 1963, *124*, 20.
6. BARKER (J.) et EL SAIFI (A.F.). — *Proc. Roy. Soc.* (London), 1952, B *140*, 385.
7. BARKER (J.) et MAPSON (L.W.). — *Proc. Roy. Soc.* (London), 1953, B *141*, 321.
8. BARR (C.G.). — *Plant. Physiol.*, 1948, *23*, 443.
9. BARTSCH (R.C.), MILLER (F.D.) et TRENT (F.M.). — *Anal. Chem.*, 1960, *32*, 1101.
10. BAYZER (H.). — *J. Chrom.*, 1967, *27*, 104.
11. BEHRENS (M.) et FISCHER (A.). — *Naturwiss*, 1954, *41*, 13.
12. BERNTSSON (S.) et SAMUELSON (O.). — *Acta Chem. Scand.*, 1955, *9*, 277.
13. BRAUN (D.) et GEENEN (H.). — *J. Chrom.*, 1962, *7*, 56.
14. BRIN (M.), OLSON (R.E.) et STARE (R.J.). — *Arch. Biochem. Biophys.* 1952, *39*, 214.
15. BRYANT (F.) et OVERELL (B.T.). — *Nature*, 1951, *167*, 361.
16. BULEN (W.A.), VARNER (J.E.) et BURREL (R.C.). — *Anal. Chem.*, 1952, *24*, 187
17. BUSCH (H.), HULBERT (R.B.) et VAN POTTER (R.). — *J. Biol. Chem.*, 1952, *196*, 717.
18. BOVE (J.) et RAVEUX (R.). — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1957, p. 376.
19. CALKINS (V.C.). — *Ind. and Gen. Chem. Anal. ed.*, 1943, *15*, 762.
20. CARLES (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1968, *50*, *1341*.
21. CARLES (J.) et ALQUIER-BOUFFARD (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1963, *45*, 157.
22. CARLES (J.) et ALQUIER-BOUFFARD (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, *47*, 1519.
23. CARLES (J.), SCHNEIDER (A.) et LACOSTE (A.M.) - *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, *40*, 221
24. CATS (H.) et ONRUST (H.). — *Chem. Weckbl.*, 1958, *54*, 456.
25. CAUSSE. — *Bull Soc. Chim*, 1894, *11*, 694.
26. COLONGE (J.). — Syntèses organiques, vol. 2, Masson Ed., 1949.
27. COWARD (R.F.) et SMITH (P.). — *J. Chrom.*, 1968, *33*, 508.
28. DANCIS (J.), HUTZLER (J.) et LEVITZ (M.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, *78*, 85.
29. DENIGES (G.). — *Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1909, *49*, 193.

30. DITTMAN (J.). — *Z. Klin. Chem.*, 1966, *4*, 266.
31. DITTMAN (J.). — *J. Chrom.*, 1968, *34*, 407.
32. DUMAZERT (C.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, *113*, 1061.
33. DUVAL (C.). — Manipulations de Chimie, Masson Ed. 1933.
34. EEGRIWE (E.). — *Z. Anal. Chem.*, 1932, *89*, 121.
35. FRIGOT (P.). — Contribution à l'étude chimique de quelques Crassulacées et en particulier de divers Sedums., Thèse d'Etat en Pharmacie, Paris 1960.
36. GEE (M.). — *Anal. Chlm.*, 1965, *37*, 926.
37. GREEN (H.). — *Analyst.*, 1957, *82*, 107.
38. HAGEDORN (M.C.) et JENSEN (B.N.). — *Bioch. Zeitschr.*, 1923, *135*, 46.
39. HAKKINEN (H. M.) et KULONEN (E.). — *J. Chrom.*, 1965, *18*, 174.
40. HARGREAVES (C.A.), ABRAHAMS (M.D.) et VICKERY (M.B.). — *Analyt. Chem.*, 1951, *23*, 467.
41. HIGGINS (H.) et VON BRAND (T.). — *Anal. Biochem.*, 1966, *15*, 122.
42. HOCKENHULL (D.J.D.) et FLOODGATE (G.D.). — *Biochem.J.*, 1952, *52*, 38.
43. HOFFMAN (N. E.) et KILLINGER (T. A.). — *Anal. Chem.*, 1969, *41*, 162.
44. HULLIN (R.P.) et NOBLE (R.L.). —*Biochem. J.*, 1953, *55*, 289.
45. ISAACS (T.L.) et BROYER (T.C.). — *Plant. Physiol.*, 1942, *17*, 296.
46. ISHERWOOD (F.A.). — *Biochem. J.*, 1946, *40*, 688.
47. JOLCHINE (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, *38*, 481.
48. JOLCHINE (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, *41*, 227.
49. KNAPPE (E.) et PETERI (D.). — *Z. Anal. Chem.*, 1962, *188*, 184.
50. KOEPSELL (H.I.) et SHARPE (E.S.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, *38*, 443.
51. LEHMANN (G.) et MATINOD (P.). — *Z. Lebensmettel. Untersuch. Forsch.*, 1966, *130*, 269.
52. LIORET (C.) et MOYSE (A.). — Acid Metabolism : the citric acid cycle and other cycles, *in* FLORKIN (M.) et MASON (H.S.) — Comparative Biochemistry 1953, *5*, part C., 203-306., Acad. Press. New York et Londres.
53. LIORET (C.) et MOYSE (A.). — Traité de Biochimie Générale, t. *3*, fasc. 1, p. 193, Masson Ed. 1967.
54. LYNES (A.). — *J. Chrom.*, 1964, *15*, 108.
55. MAROC (J.). — *Physiol. Veget.*, 1967, *5*, *37*.
56. MAROC (J.). — *Physiol. Veget.*, 1967, *5*, 47.
57. MIYAZAKI (S.), SUHARA (Y.) et KOBAYASHI (T.). — *J. Chrom.*, 1969, *39*, 89.
58. MOHLER (E.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1890, (3), *4*, 728.
59. MOYSE (A.) et JOLCHINE (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, *39*, 725.
60. MYERS (W.F.) et HUANG (K.Y.). — *Anal. iBochem.*, 1966, *17*, 210.
61. NORMANN (R.) et NORMANN (J.). — Traité de Biochimie Générale, T. *3*, Fasc. 1, p. 289, Masson Ed., 1967.
62. NOSSAL (P.M.). — *Biochem. J.*, 1951, *49*, 407.
63. NOSSAL (P.M.). — *Biochem. J.*, 1952, *50*, 349.
64. NYGGARD (P.). — *J. Chrom.*, 1967, *30*, 240.
65. OVERELL (B.T.). — *Austral. J. of Sci.*, 1952, *15*, 28.

66. OWENS (H.S.), GOODBAN (A.E.) et STARK (J.B.). — *Analyt. Chem.*, 1953, *25*, 1507.
67. PASSERA (C.), PEDROTTI (A.) et FERRARI (G.). — *J. Chrom.*, 1964, *14*, 290.
68. PESEZ (M.). — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1936 (5), *3*, 676, et 2072.
69. PETROWITZ (H.J.) et PASTURKA (G.). — *J. Chrom.*, 1962, *7*, 128.
70. PHARES (E.F.) et MOSBACH (E.H.). — *Analyt. Chem.*, 1952, *24*, 660.
71. PUCHER (G.W.). — *J. Biol. Chem.*, 1942, *145*, 511.
72. PUCHER (G.W.). — *Anal. Chem.*, 1942.
73. QUEIROZ (O.). — *Physiol. Veget.*, 1970, *8*, 75.
74. RADIN (N.S.) et METZLER (D.E.). — *In* Biochemical preparations, vol. 4, p. 60, John Wiley and sons Inc. New York 1955.
75. RAJAGOPAL (N.S.), SARASWATHY (P.K.), SUBBARAM (M.R.) et ACHAYA (K.T.). — *J. Chrom.*, 1966, *24*, 217.
76. RANSON (S.L.). — Modern Methoden der Pflanzenalyse, M.V. Tracey, Spring. 1955, *2*, 539.
77. RASMUSSEN (H.). — *J. Chrom.*, 1966, *26*, 512.
78. RAVEUX (R.) et BOVE (J.). — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1957, p. 369.
79. RINK (M.) et HERMANN (S.). — *J. Chrom.*, 1964, *14*, 523.
80. RONKAINEN (P.). — *J. Chrom.*, 1965, *20*, 403.
81. RONKAINEN (P.). — *Suomen Kemistilehti*, B 37, 1964, 209.
82. RONKAINEN (P.). — *J. Chrom.*, 1965, *13*, 463.
83. RUHLAND (W.) et WETZEL (K.). — *Planta*, 1926, *1*, 558
84. SAINI (A.S.). — *J. Chrom.*, 1967, *26*, 539
85. SAMUELSON (O.) et JOHNARD (B.). — *Swensk. Kem. tidskr.*, 1961, *73*, 586
86. SCHWEIGER (A.). — *Z. Lebensmittel. Untersuch. Forsch.*, 1963, *12*, 571
87. SMITH (F.) et SPRIESTERBACH (D.). — *Nature*, 1954, *174*, 466.
88. STEINMANN (A.B.). — *Z. Bot.*, 1917, *9*, 1.
89. STUTZ (R.E.) et BURRIS (R.H.). — *Plant. Physiol.*, 1951, *26*, 226.
90. TAVANT (H.). — *Physiol. Veget.*, 1967, *5*, 57.
91. THOMPSON (A.C.) et HEDIN (P.A.). — *J. Chrom.*, 1966, *21*, 13.
92. TINGD (J.P.) et DUGGER (W.M.). — *Anal. Biochem.*, 1965, *12*, 571.
93. TROP (M.), SPRECHER (M.) et PINSKY (A.). — *J. Chrom.*, 1968, *32*, 426
94. VEIL-MALHERBE (H.). — *Biochem. J.*, 1937, *31*, 299.
95. VISCKERY (H.B.). *In* Biochemical préparations, vol. 3., p. 44, John Wiley and Sons Inc. New York, 1953.
96. VICKERY (H.B.). — *Plant. Physiol.*, 1952, *27*, 9.
97. VIRTANEN (A.I.), MIETTINEN (J.K.) et KUNTTU (H.). — *Acta Chem. Scand.* (Copenh.), 1953, *7*, 38.
98. WHITTEFIELD (A.E.). — *J. Chrom.*, 1960, *4*, 350.
99. WHITEFIELD (A.E.). — *J. Chrom.*, 1965, *20*, 401.
100. WOLF (J.). — Modern Methoden der Pflanzenanalyse, M.V. Tracey Spring, 1955, *2*, 478.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 13

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE 15

I. — METABOLISME DES ACIDES ORGANIQUES 15

A) FIXATION DU GAZ CARBONIQUE PAR LES VEGETAUX 15

1° Carboxylation du ribulose-1, 5-diphosphate 15

2° β-carboxylation du phospho-énol-pyruvate 17

3° Réversibilité des carboxylations oxydatives 17

4° Enzymes à biotine 18

5° Formations du carbamyl-phosphate 18

B) LES OXYDATIONS CELLULAIRES 18

C) CATABOLISME 19

D) ANABOLISME 21

E) ACCUMULATION DES ACIDES ORGANIQUES CHEZ LES VEGETAUX 23

II. — TECHNIQUES ANALYTIQUES RELATIVES A L'IDENTIFICATION ET AUX DOSAGES DES ACIDES ORGANIQUES CHEZ LES VEGETAUX 25

A) EXTRACTION 25

B) METHODES DE SEPARATION ET D'IDENTIFICATION 26

1° Chromatographie sur colonne 27

a - Chromatographie par échange d'ions 27

b - Chromatographie sur gel de silice 28

c - Chromatographie sur Celite 28

d - Chromatographie en phase gazeuse 29

2° Chromatographie sur support 29

a - Chromatographie sur papier 29

b - Chromatographie sur couche mince 30

C) METHODES SCIENTIFIQUES D'IDENTIFICATION ET DE DOSAGE 30

1° Méthodes chimiques 31

2° Méthodes enzymatiques 33

Pages

OBJET DU TRAVAIL 35

RECHERCHES PERSONNELELS 37

CHAPITRE I : MATERIEL ET TECHNIQUES 37

1) MATERIEL VEGETAL 37
A) Traitement des végétaux frais 37
B) Traitement des végétaux secs 37

II) TECHNIQUES ANALYTIQUES 38
A) Teneur en eau, cendres et matières minérales.. 38
B) Dosage des sucres réducteurs 38
C) Détermination de l'acidité totale 39
D) Dosage de l'acide oxalique 39

III) SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE SUR COLONNE DE CELITE 39
A) Mode opératoire 40
B) Expression des résultats 42
C) Vérification de l'efficacité de la technique. Chromatographie d'acides organiques étalons.. 42

IV) IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER 43
A) Mode opératoire 43
B) Technique 44
C) Expression des résultats 45

CHAPITRE II : LES ACIDES ORGANIQUES DE *Bryophyllum daigremontianum*, Berger 47

CHAPITRE III : LES ACIDES ORGANIQUES DE *Bryophyllum crenatum*, Baker et de *Bryophyllum calycinum*, *Salisb* 53

CHAPITRE IV : LES ACIDES ORGANIQUES DE LA CAROTTE (*Daucus carota*, L.) 59

CHAPITRE V : LES ACIDES ORGANIQUES DE LA VIGNE VIERGE (*Ampelopsis hederacea*, Michx.) 63

CHAPITRE VI : LES ACIDES ORGANIQUES DE L'OSEILLE (*Rumex acetosa*, L.) 69

CHAPITRE VII : DISCUSSION DES RESULTATS 73

RESUME ET CONCLUSION 77

BIBLIOGRAPHIE 83